

**Samilla Driessen Schroeder**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DA DIPIRONA E SEUS  
PRINCIPAIS METABÓLITOS NA NOCICEPÇÃO AGUDA E  
HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDAS POR ENDOTELINA-  
1 NA PATA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander  
Rae

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Luiz

**Florianópolis  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schroeder, Samilla Driessen

Efeitos antinociceptivos da dipirona e seus principais  
metabólitos na nocicepção aguda e hiperálgia mecânica  
induzidas por endotelina-1 na pata de camundongos /  
Samilla Driessen Schroeder ; orientador, Giles Alexander  
Rae ; coorientador, Ana Paula Luiz. - Florianópolis, SC,  
2014.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

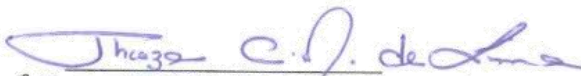
1. Farmacologia. 2. Dor. 3. Dipirona. 4. Endotelina. I.  
Rae, Giles Alexander. II. Luiz, Ana Paula. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Samilla Driessen Schroeder

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DA DIPIRONA E SEUS  
PRINCIPAIS METABÓLITOS NA NOCICEPÇÃO AGUDA E  
HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDAS POR ENDOTELINA-  
1 NA PATA DE CAMUNDONGOS**

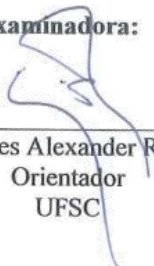
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2014.



Prof<sup>a</sup> Thereza Christina Monteiro de Lima, Dr<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

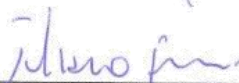
**Banca Examinadora:**



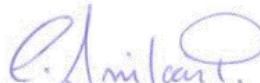
Prof. Giles Alexander Rae, Dr.  
Orientador  
UFSC



Ana Paula Luiz, Dr.<sup>a</sup>  
Corientadora  
UFSC



Prof. Juliano Ferreira, Dr.  
UFSC



Prof. Carlos A. Parada, Dr.  
UNICAMP



Prof<sup>a</sup> Aurea Elizabeth Linder, Dr<sup>a</sup>  
UFSC



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Klaiton e Ligia, por todo o apoio e amor incondicional. Por me mostrarem o que é o verdadeiro companheirismo e servirem de exemplo. Vocês são o meu porto seguro, sempre, e tem meu profundo respeito e agradecimento. Muito, mas muito, obrigada.

Ao meu orientador, Prof. Giles, por ter me aceitado e me orientado por quase seis anos. Obrigada pelo apoio e por ter expandido meus horizontes, tanto científicos quanto pessoais. Muito obrigada.

À minha co-orientadora (e “mãe científica”), Ana Paula Luiz. Muito obrigada pela paciência, ensinamentos e, acima de tudo, pela confiança. Você me ajudou a me sentir mais forte e capaz. Muito obrigada pela amizade e ajuda, mesmo que à distância.

À Profa. Dra. Glória E. P. de Souza, Laboratório de Farmacologia, Departamento Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, pela sua fundamental ajuda na intermediação da doação do metabólito 4-metilaminoantipirina, tão importante para o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao meu irmão, Stephan, pelo apoio e puxões de orelha merecidos. Você é o meu exemplo e tem o meu respeito incondicional. À minha cunhada, Chris, por fazê-lo feliz e, conseqüentemente, deixar-me deixar mais feliz também. Muito obrigada aos dois.

Ao Ademar Izu Gomes, pela compreensão no meio de todo o mau humor e fins de semana de trabalho, e por sempre conseguir arrancar um sorriso, independente das circunstâncias. Muito obrigada por ter entrado na minha vida e por sempre estar lá, disponível, no fim do dia.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, Alessandra, Stefânia e Lenyta. Pelas conversas, fofocas, desabafos, discussões... Por estarem lá, dia após dia, e por tornarem esses anos mais fáceis e prazerosos. Muito obrigada pelo companheirismo.

À Renata, minha amiga de infância que eu conheci na faculdade. Obrigada pelos lanches de fim de tarde e almoços, ótimas oportunidades para desabafos muito necessários. Mesmo em departamentos diferentes,

passamos por essa jornada juntas e a sua compreensão e apoio foram muito importantes para mim. Muito, muito obrigada.

Às minhas amigas Juliana, Gabriela T., Mariana R., Mariana C., Andressa e Gabriela P. pela amizade. Embora a rotina e a distância tenham reduzido o nosso convívio, vocês ocupam um lugar especial no meu coração. Obrigada por crescerem comigo, pelas histórias e fofocas. Estarei aqui, sempre.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, por serem tão prestativos e facilitarem as nossas vidas. Aos funcionários do LAMEB II, pelo auxílio com a histologia.

Aos Professores do PPG Farmacologia, por contribuírem com o meu crescimento científico e formação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

*“O que é um cientista? É um curioso espiando pelo buraco da fechadura da natureza e tentando entender o que está acontecendo.” - Jacques Cousteau*





## RESUMO

A dipirona foi introduzida na prática clínica em 1922. Entretanto, apesar dos mais de 90 anos de uso, o seu mecanismo analgésico ainda não foi completamente elucidado. Como já foi demonstrado que a febre induzida por ET-1 é bloqueada pelo tratamento sistêmico com dipirona, neste trabalho avaliamos a capacidade da dipirona e dos seus metabólitos, 4-AA e 4-MAA, de atenuar a nocicepção aguda e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1. Camundongos receberam uma injeção de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita e, por 30 min, foi cronometrado o tempo gasto lambendo a pata injetada como índice de nocicepção declarada. Em seguida, os animais foram eutanaziados e as patas, coletadas para determinação do edema. Em outro experimento, os animais foram avaliados entre 30 min e 5 h após a injeção de ET-1 através do número de reações de retirada da pata após 10 aplicações do filamento de Von Frey (0,6 g) em intervalos de 30 s, com o objetivo de determinar a hiperalgesia mecânica. O tratamento com a dipirona e seus metabólitos foi feito pelas via sistêmica (i.p., 30 min antes da ET-1), local (s.c. na pata, 20 min antes da ET-1) ou central (i.t.; 15 min antes da ET-1). Foi realizada determinação da atividade da MPO, contagem de células inflamatórias e quantificação dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 na pele da pata dos animais 15 min ou 4 h após a administração de ET-1. Na nocicepção aguda, todas as substâncias foram efetivas, mas apenas através das vias i.p. e i.t., sendo que a administração de doses semelhantes dos dois metabólitos sugere que a 4-AA é mais efetiva que a 4-MAA. Nenhum tratamento apresentou efeito anti-edematogênico. Na hiperalgesia mecânica o tratamento pelas vias i.p., s.c. e i.t. mostrou efeito anti-hiperalgésico, mas apenas a dipirona e a 4-MAA foram efetivas. A administração de ET-1 não provocou aumento da atividade de MPO ou induziu migração de células inflamatórias para o sítio da administração, mas aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  apenas 4 h após a administração do peptídeo, mostrando sua importância para o estabelecimento da hiperalgesia mecânica, mas não da nocicepção aguda. Os níveis de IL-10, contudo, não foram alterados. O pré-tratamento i.p. com dipirona ou 4-MAA reduziu esses níveis, mas a 4-AA não surtiu efeito. Portanto, o efeito antinociceptivo da dipirona e de seus metabólitos na nocicepção aguda induzida por ET-1 é principalmente central, enquanto que o efeito anti-hiperalgésico é resultante de fatores centrais e locais que envolvem a ação de IL-1 $\beta$ , provavelmente de células locais e residentes.

**Palavras-chave:** Dor; dipirona; 4-AA; 4-MAA; endotelinas.



## ABSTRACT

Dipyrone was introduced into the clinical practice in 1922. However, despite of being used for over 90 years, the mechanism of its analgesic action still has not being completely elucidated. As it was already shown ET-1-induced fever is blocked by systemic pre-treatment with dipyrone, in this study we evaluated the ability of dipyrone and its main metabolites, 4-AA, and 4-MAA, to attenuate ET-1-induced acute nociception and mechanical hyperalgesia. Mice received an s.c. ET-1 injection (10 pmol) into the right hindpaw and the time spent licking the injected paw was determined throughout a period of 30 min. By the end of the test the animals were euthanized and the paws were collected for oedema determination. In another set of experiments, animals were evaluated from 30 min up to 5 h after ET-1 administration for mechanical hyperalgesia through the number of paw withdrawal after 10 applications of a von Frey filament (0,6 g) in 30 s intervals. Pre-treatment with dipyrone and its metabolites was done through the systemic (i.p., 30 min before ET-1), local (s.c., 20 min before ET-1) or central (i.t., 15 min before ET-1) routes. Inflammatory cells migration was determined through histology with HE colouring and quantification MPO activity. The quantification of the cytokines IL-1 $\beta$  and IL-10 was also performed. In the acute nociception all the drugs were effective, but only the i.p. and i.t. routes. The administration of similar doses of the metabolites suggests that 4-AA is more effective than 4-MAA. No treatment showed anti-oedematogenic effects. Mechanical hyperalgesia was attenuated through all the treatment routes, but only dipyrone and 4-MAA were effective. ET-1 did not cause increase in MPO activity or induced inflammatory cell migration, but increased IL-1 $\beta$  levels (only 4 h after ET-1, which shows that this cytokine is important for the establishment of mechanical hyperalgesia). IL-10 levels remained unaffected. The IL-1 $\beta$  levels were diminished only in animals pre-treated with i.p. dipyrone or 4-MAA. Therefore, the antinociceptive effect of dipyrone and its metabolites in acute nociception induced by ET-1 results mainly from central action, while the anti-hyperalgesic effects appeared from a combination of central and local components, involving IL-1 $\beta$  liberation, most likely from local and resident cells. Thus, we showed evidences that indicate a new mechanism through which dipyrone may act as an analgesic drug.

**Key words:** Pain; dipyrone; 4-AA; 4-MAA; endothelins.



<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Pág</b>
<b>Figura 1</b> - Metabolismo da dipirona.....	<b>30</b>
<b>Figura 2</b> - Representação da divisão dos campos de contagem em 5 retângulos.....	<b>47</b>
<b>Figura 3</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na primeira fase da nocicepção induzida por formalina.....	<b>52</b>
<b>Figura 4</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na segunda fase da nocicepção induzida por formalina.....	<b>53</b>
<b>Figura 5</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por formalina.....	<b>55</b>
<b>Figura 6</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.....	<b>57</b>
<b>Figura 7</b> - Efeito do pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.....	<b>58</b>
<b>Figura 8</b> - Efeito do pré-tratamento central com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.....	<b>60</b>
<b>Figura 9</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.....	<b>61</b>
<b>Figura 10</b> - Efeito do pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.....	<b>62</b>
<b>Figura 11</b> - Efeito do pré-tratamento central com dipirona, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.....	<b>63</b>
<b>Figura 12</b> - Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1.....	<b>65</b>
<b>Figura 13</b> - Efeito do pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1.....	<b>66</b>
<b>Figura 14</b> - Efeito do pré-tratamento central com dipirona, 4-	

AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1.....	67
<b>Figura 15</b> - Participação das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-10 na nocicepção e hiperalgesia induzidas por ET-1 e no efeito antinociceptivo da dipirona e seus principais metabólitos.....	69
<b>Figura 16</b> - Efeito da administração de ET-1 (10 pmol) ou PBS na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata de camundongos.....	71
<b>Figura 17</b> - Efeito da administração de ET-1 (10 pmol) ou PBS na migração de células inflamatórias na pata de camundongos.....	72
<b>Figura 18</b> - Participação da 4-AA e 4-MAA nos efeitos antinoceptivo e anti-hiperalgésico da dipirona na nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos.....	90

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> - Relação das doses administradas de dipirona, 4-AA ou 4-MAA e das vias de administração utilizadas.....	<b>48</b>





## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

2-AG	2-acilglicerol
4-AA	4-aminoantipirina
4-FAA	4-formil-aminoantipirina
4-MAA	4-metil-aminoantipirina
5-HT	Serotonina
AAA	Acetil-amino-antipirina
AAS	Ácido acetilsalicílico
ACC	Córtex anterior cingulado
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canais iônicos sensíveis a ácido
ATP	Adenosina trifosfato
BQ-123	Antagonista peptidérgico seletivo do receptor ET <sub>A</sub>
BQ-788	Antagonista seletivo peptidérgico do receptor ET <sub>B</sub>
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EDTA	Ácido etilenediamina tetracético
ECE	Enzima conversora de endotelina
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ET	Endotelina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GRK2	Proteína quinase 2 acoplada à proteína
H-TAB	Hexadeciltrimetilamônio
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IC	Córtex insular
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato

i.t.	Intratecal
JNK	Proteína quinase c-Jun-NH <sub>2</sub> - terminal
L-NMMA	Sal de acetato de N-metil-L-arginina
LOX	Lipooxigenase
LPS	Lipolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MPO	Mieloperoxidase
NGF	Fator de crescimento neuronal
NK1	Receptor de neurocinina 1
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NRM	Núcleo magno da rafe
P2X <sub>3</sub>	Subtipo de receptore para purinas
PAG	Massa cinzenta periaquedutal
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína quinase C
PL	Fosfolipase
pmol	Picomol
RET	Subfamília de receptores tirosina kinase
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RVM	Porção rostral da medula oblonga ventromedial
S1	Córtex somatosensorial primário
S2	Córtex somatosenrial secundário
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TrkA	Receptores tirosina quinase
Trp	Tripsina
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA	Receptor de potencial transitório anquirina
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
TTX <sub>r</sub>	Canais de sódio resistentes à tetrodotoxina
TTX <sub>s</sub>	Canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina
TXB <sub>2</sub>	Tromboxano B <sub>2</sub>
Val	Valina
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Micrômetro	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. Dor.....	21
1.2. Dor inflamatória .....	24
1.3. Dipirona .....	28
1.4. Sistema endotelinérgico.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1. Objetivo geral .....	39
2.2. Objetivos específicos .....	39
<b>3. MATERIAL .....</b>	<b>41</b>
3.1. Animais .....	41
3.2. Reagentes, drogas e soluções .....	41
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. Experimentos comportamentais .....	43
4.1.1. Nocicepção induzida por formalina .....	43
4.1.2. Nocicepção induzida por endotelina-1 .....	43
4.1.3. Hiperalgesia mecânica induzida por endotelina-1 .....	43
4.2. Determinação do edema de pata .....	44
4.3. Quantificação dos níveis de citocinas .....	44
4.4. Análise de migração de células inflamatórias .....	45
4.4.1. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) .....	45
4.4.1. Análise histológica .....	46
4.5. Tratamentos .....	47
4.5.1 Tratamento sistêmico – via intraperitoneal .....	48
4.5.2 Tratamento local – via subcutânea .....	48
4.5.3 Tratamento central – via intratecal .....	48
4.6. Análise estatística .....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>

5.1. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na nocicepção induzida por formalina na pata de camundongos .....	51
5.2. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na nocicepção e edema induzidos por ET-1 na pata de camundongos .....	56
5.3. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 na pata de camundongos .....	64
5.4. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias na pele da pata de camundongos .....	68
5.5. Análise da migração de células inflamatórias induzida por ET-1 na pata de camundongos .....	70
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>115</b>
9.1. Documento de aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina ...	115

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dor

Em 1986 a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional associada a danos reais ou potenciais, ou descrita em termos de tal lesão”. Essa definição leva em consideração a subjetividade do fenômeno da dor, dando base à ideia de que ela apresenta um componente individual expressivo e é influenciada por experiências prévias (Almeida, Roizenblatt e Tufik, 2004).

A dor possui caráter protetor e age como um sinal de alerta em relação a eventos potencialmente danosos ao organismo, forçando-o a tomar atitudes a fim de evitar a lesão. Entretanto, quando persistente, ela deixa de ser um sintoma e pode se tornar a doença em si, sendo destituída de um papel fisiológico. A dor como função protetora é representada pela dor aguda, caracterizada por uma rápida sensação desagradável que se atenua ou desaparece juntamente com o estímulo nocivo. Já a dor como doença é observada em indivíduos com dor crônica, havendo uma perpetuação dos sinais dolorosos no sistema nervoso, debilitando e causando sofrimento aos seus portadores (Marchand, 2010).

Apesar de apresentar um cunho claramente emocional em seres humanos, em modelos animais pré-clínicos a porção afetiva da dor é de difícil análise. A grande maioria dos modelos encontrados na literatura determina a intensidade da sensação dolorosa através da magnitude da resposta comportamental do animal ou eletrofisiológica de algumas vias implicadas na percepção ou transmissão da informação dolorosa. Dessa forma, há desconsideração dos aspectos psicológicos envolvidos na sensação dolorosa e, por esse motivo, a dor em animais é adequadamente definida como “nociceção” (Loeser e Treede, 2008).

A aplicação desses estímulos nocivos é seguida por eventos elétricos e químicos que podem ser didaticamente organizados em diferentes estágios: transdução, transmissão e percepção. Na transdução ocorre a conversão de energia nociceptiva externa em atividade eletrofisiológica através da ativação de nociceptores, estruturas neuronais responsáveis pela detecção de estímulos aplicados em seus campos receptivos periféricos. Para ser classificado como nociceptor duas condições devem ser respeitadas: a resposta gerada pelo estímulo nociceptivo deve ser proporcional à sua intensidade e o seu limiar de ativação deve ser maior do que aquele encontrado em fibras responsivas

a estímulos inócuos. A maioria dos nociceptores é polimodal, respondendo a diferentes tipos de estímulos nociceptivos (mecânicos, térmicos e químicos), e se localiza nas terminações nervosas de uma porção de fibras sensoriais aferentes primárias conhecidas como fibras nociceptivas, sensíveis a estímulos nocivos ou danosos e encontradas na maioria dos tecidos, incluindo a pele, tecido somático profundo (músculos e articulações) e vísceras (Gold e Gebhart, 2010; Moffat e Rae, 2011). A sua falta de especificidade é explicada pela necessidade de proteção e distanciamento imediatos da fonte nociva e contrasta com a seletividade responsiva de receptores não-nociceptivos (Kidd e Urban, 2001).

As fibras aferentes primárias, de forma geral, são classificadas em duas grandes classes: A e C. As fibras A são mielinizadas e podem ser subdivididas em A $\alpha$ , A $\beta$  e A $\delta$ , de acordo com o seu diâmetro e velocidade de condução. As fibras A $\alpha$  e A $\beta$  estão relacionadas à propriocepção e à condução de estímulos não-nociceptivos (vibração, movimento e toque leve), apresentando grande diâmetro e conduzindo estímulos a uma velocidade alta (velocidade média de 50-95 m/s para as fibras A $\alpha$  e 35-75 m/s para as A $\beta$ ). As fibras A $\delta$ , por sua vez, apresentam diâmetro menor e velocidade de condução mais lenta (5-30 m/s) e são categorizadas de acordo com a especificidade das suas respostas a diferentes estímulos nocivos. Elas respondem a estimulações mecânicas, químicas e térmicas e são sub-classificadas em Tipo I e Tipo II, de acordo com seu limiar térmico (ativadas por temperaturas de ~ 45 °C e ~53 °C, respectivamente) (Julius e Basbaum, 2001; Woolf e Ma, 2005; Marchand, 2010).

As fibras do tipo C, por sua vez, possuem baixo calibre e ausência de mielina, o que reflete em uma baixa velocidade de condução (0,5-2 m/s). Essas fibras representam três quartos da aferência sensorial e são recrutadas principalmente por estímulos nociceptivos, mas também estão envolvidas na transmissão de outras informações somatosensoriais, como o prurido. Graças à sua baixa velocidade de condução, elas são responsáveis pela sensação secundária de dor, que é difusa e não localizada. A dor primária, uma sensação aguda e que gera o reflexo de retirada, é produzida pela ativação de fibras A $\delta$ , que possuem maior velocidade de condução. Dentro do grupo de fibras C há uma subpopulação de neurônios (representando cerca de 15% do número total desse tipo de fibra) que apresenta alto limiar de ativação e que não responde a estímulos térmicos e mecânicos em condições fisiológicas. Durante um processo inflamatório ou após lesão tecidual, no entanto, essas fibras sofrem sensibilização e tornam-se responsivas a

esses estímulos, o que lhes rendeu a denominação de “nociceptores dormentes ou silenciosos”. Além disso, estudos histoquímicos do gânglio da raiz dorsal (DRG) de adultos revelaram que há duas classes de fibras C: peptidérgicas e não-peptidérgicas. A primeira engloba neurônios que contêm substância P (um peptídeo com função neurotransmissora) e expressa TrkA (receptor do tipo tirosina quinase que possui alta afinidade pelo fator de crescimento neuronal – NGF). Já o grupo não-peptidérgico não apresenta essas proteínas, mas expressa o receptor P2X<sub>3</sub> (um canal iônico ativado pela ligação com ATP), o receptor tirosina quinase RET (ativado pela neurotrofina GDNF, também envolvida no crescimento do nervo) e possui sítios de ligação para isolectina B<sub>4</sub> (Julius e Basbaum, 2001; Marchand, 2010; Gold e Gebhart, 2010).

As fibras sensoriais que inervam as regiões da cabeça e tecidos periféricos se originam de corpos celulares localizados nos gânglios trigeminal e DRG, respectivamente. Estas últimas são fibras pseudo-unipolares, possuindo, portanto, um axônio que se divide em dois ramos: um periférico (parte do corpo celular em direção a regiões periféricas, como pele, articulações e músculos) e um central (se origina no corpo celular e se direciona para o corno da raiz dorsal da medula espinhal). Estas estruturas são importantes para o segundo estágio do processamento da dor, que é conhecido como transmissão e envolve a realização de sinapses entre as terminações medulares dos ramos aferentes e neurônios de segunda ordem. Este fenômeno é responsável pela chegada dos estímulos nociceptivos a estruturas cerebrais, onde ocorre o seu processamento (Moffat e Rae, 2011; Marani e Lakke, 2011).

A massa cinzenta da medula espinhal é subdividida em dez lâminas, conhecidas como lâminas de Rexed (Rexed, 1952). As lâminas de I a VI correspondem ao corno dorsal da medula, sendo que as fibras C e A $\delta$  terminam na lâmina I (zona marginal) e II (substância gelatinosa). Nas lâminas V e VI se encontram interneurônios excitatórios e inibitórios que regulam o fluxo de informações nociceptivas. As células que respondem a estímulos inócuos, por sua vez, são encontradas principalmente na lâmina III (Moffat e Rae, 2011).

A resposta espinhal a estímulos nocivos não relacionados a dano tecidual é mediada, em um primeiro momento, pelo aminoácido excitatório glutamato, agindo nos seus receptores ionotrópicos  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol (AMPA). Estimulações repetidas ou em maior intensidade (como aquelas relacionadas a dano tecidual), no entanto, estão associados à expressão funcional do receptor *N*-metil-D-aspartato

(NMDA), cuja ativação leva a uma sequência de eventos que provocam o aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal. Estímulos de grande intensidade também estão relacionados com a liberação de neuropeptídeos, incluindo substância P. Esse peptídeo age através de receptores específicos do tipo neurocininas-1 (NK1) localizados em neurônios do corno da raiz dorsal, exacerbando a resposta pós-sináptica e aumentando a atividade dos receptores NMDA (Kidd e Urban, 2001).

Os neurônios de segunda ordem cujos terminais se encontram na medula espinhal levam as informações recebidas aos centros nervosos superiores por duas vias principais: trato espinotalâmico (culmina no núcleo lateral do tálamo e se originam nas lâminas I, IV, V e VI) e trato espinoreticular (originário das lâminas VII e VIII e cujas aferências vão em direção ao tálamo medial e ao núcleo do tronco encefálico, incluindo regiões envolvidas no controle descendente da dor), sendo que o segundo é o responsável pela formação da memória da dor e pelo seu componente afetivo (Marchand, 2010; Moffat e Rae, 2011).

Vários núcleos talâmicos relacionados à nociceção têm projeções até a área cortical do cérebro, cuja oxigenação sanguínea é alterada durante fenômenos dolorosos. Estudos de imagem detectaram que uma complexa rede de estruturas corticais é ativada durante a percepção da dor, sendo que quatro regiões apresentam maior importância: os córtices somatosensoriais primário e secundário (S1 e S2, respectivamente, envolvidos nos aspectos sensorial e discriminativo da dor), o córtex cingulado anterior (ACC) e o córtex insular (IC), sendo que os dois últimos estão ligados ao componente afetivo do processo da dor (Marchand, 2010; Moffat e Rae, 2011).

## **1.2. Dor inflamatória**

A inflamação é uma resposta do organismo à infecção, à ligação de anticorpos a antígenos, à irritação mecânica ou à lesão, sendo que a dor é um dos seus sinais cardinais, juntamente com rubor, calor, edema e, eventualmente, a perda de função. Enquanto o processo inflamatório restrito e controlado é benéfico, auxiliando na proteção do tecido lesado e na sua cicatrização, a inflamação persistente ou excessiva leva à destruição do tecido e a várias patologias (Rhen e Cidlowski, 2005).

A regulação do estado inflamatório é um processo complexo e que envolve a interação entre o sistema nervoso e componentes do sistema imunológico inato e adaptativo. Após a lesão tecidual, a resposta inflamatória é iniciada por macrófagos residentes e amplificada por



células sanguíneas migratórias. A ativação dessas estruturas celulares leva à liberação de mediadores químicos que integram as classes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, efetores da cascata do complemento (C3a e C5a) e vasodilatadores, incluindo aminas vasoativas e a bradicinina. Neutrófilos, monócitos e linfócitos T provenientes do sangue se aderem às paredes dos vasos, sofrem extravasamento e se acumulam no sítio da lesão, podendo contribuir para a sensibilização nociceptiva periférica ao liberar fatores solúveis que interagem diretamente com nociceptores (Ren e Dubner, 2010). Os tipos de células imunológicas que são recrutadas e contribuem para a dor inflamatória dependem da condição da inflamação. De forma geral, após a ativação dessas células no local da lesão tecidual, estas liberam mediadores pró-inflamatórios (citocinas, interleucinas, vasodilatadores, prostanoídes, etc.) que, juntamente com produtos derivados da degradação e inflamação do tecido lesado (prótons extracelulares, metabólitos do ácido araquidônico, serotonina, bradicinina, nucleotídeos e endotelinas, por exemplo), formam a chamada “sopa inflamatória” (Marchand, Perretti e MacMahon, 2005).

Os nociceptores expressam um ou mais receptores em sua superfície celular capazes de reconhecer ou responder a cada um dos componentes dessa “sopa”, o que leva ao aumento da excitabilidade da fibra nociceptiva e/ou à sua sensibilização (Basbaum et al., 2009). Quando ativados, os neurônios nociceptivos podem liberar neurotransmissores (substância P, CGRP e ATP, por exemplo) de seus terminais periféricos, que são capazes de facilitar a produção da sopa inflamatória ao promover a liberação de fatores de células vizinhas não-neurais e de tecido vascular, um fenômeno conhecido como inflamação neurogênica (também chamada de inflamação estéril devido à ausência de patógenos), que, por sua vez, influencia na migração de neutrófilos e amplifica a mensagem nociceptiva ao recrutar fibras adjacentes ativadas ou sensibilizadas (Julius e Basbaum, 2001; Marchand, Perretti e McMahon, 2005; Rhen e Cidlowski, 2005; Ren e Dubner, 2010). Um dos possíveis cenários discutidos atualmente é que fragmentos da cascata do complemento também são capazes de ativar fibras C nociceptivas, auxiliando na gênese da inflamação neurogênica (Jang et al., 2010).

Alguns dos mediadores presentes na sopa inflamatória (íons potássio, íons hidrogênio, bradicinina e ATP, principalmente) são agentes desencadeantes e levam ao surgimento da nocicepção declarada (dor inflamatória aguda), enquanto outros apenas sensibilizam os nociceptores a certos estímulos (definida como redução no limiar e

aumento da magnitude da resposta a estímulos nocivos) (Gold e Gebhart, 2010). A sua ação pode acarretar alterações plásticas (centrais e periféricas) observadas em neurônios responsáveis pela transmissão do sinal nociceptivo, sendo que no decorrer do processo inflamatório frequentemente surge dor espontânea, além de haver a possibilidade de desenvolvimento de hiperalgesia (resposta exacerbada a estímulos nocivos, caracterizado pela redução do limiar de excitabilidade e pelo aumento da atividade espontânea e da frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais) e alodinia (resposta nociceptiva a estímulos normalmente inócuos) no local inflamado (Marchand, Perretti e McMahon, 2005). Dessa forma, enquanto sinais e sintomas causados pela exposição de tecidos intactos à estimulação nociva geralmente refletem a intensidade e localização do estímulo recebido, a dor derivada de tecidos inflamados ou danificados pode surgir de forma espontânea, na ausência de um iniciador externo. Essa dor é inespecífica e a sua fisiopatologia é de difícil identificação (Kidd e Urban, 2001; Woolf e Salter, 2000; Zeilhofer e Zeilhofer, 2008).

A inflamação neurogênica está intimamente relacionada ao aparecimento da hiperalgesia inflamatória primária (originária no local da lesão tecidual), processo no qual diversos fatores atuam de forma conjunta para levar à ativação (direta ou indireta) de nociceptores. Tal ativação faz com que terminações de neurônios não-mielinizados liberem neuropeptídeos no espaço intersticial, como a substância P, que se liga ao seu receptor específico, NK-1. Essa interação causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, provocando extravasamento plasmático e degranulação de mastócitos. Essas células, por consequência, liberam histamina, que amplifica os processos vasculares e ativa e sensibiliza os nociceptores. Eventualmente, esses fenômenos ultrapassam as barreiras da área da lesão e atingem tecidos intactos, surgindo, assim, a hiperalgesia secundária (Coutaux et al., 2005). Em certas condições inflamatórias pode ocorrer uma alteração fenotípica em fibras A $\beta$ , que, fisiologicamente, não provocam nocicepção após serem estimuladas. Nessas situações, esses tipos de fibras estabelecem novas sinapses (com nociceptores de segunda ordem) e passam a sintetizar e liberar substância P no corno dorsal da medula espinhal, aumentando a responsividade de neurônios espinhais e contribuindo para o surgimento da hiperalgesia (Neumann et al., 1996).

Outros mediadores também podem estar envolvidos nesse processo de sensibilização, sendo liberados no início e durante a inflamação (levando à liberação de outros mediadores) ou no seu estágio final (interagindo diretamente com receptores específicos presentes em

neurônios aferentes primários, ativando e sensibilizando-os) (Woolf e Salter, 2000; Zeilhofer e Zeilhofer, 2008).

A ativação de receptores pelos mediadores finais leva à indução de cascatas de sinalização intracelulares que culminam na regulação da atividade de canais iônicos. Um dos principais mensageiros intracelulares envolvidos na dor inflamatória é o adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), que ativa proteínas quinases que agem na modulação de canais iônicos, fosforilando-os e alterando sua propensão à ativação de forma positiva ou negativa e, dessa forma, aumentando a excitabilidade da membrana celular e facilitando a transmissão do sinal nociceptivo (Hucho e Levine, 2007).

Canais de sódio também são extremamente importantes na perpetuação do sinal nociceptivo. Quando a despolarização de uma região neuronal alcança certo patamar, canais de sódio voltagem-dependentes da membrana abruptamente se abrem, gerando um potencial de ação. Eles podem ser encontrados em diferentes partes de fibras aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas, sendo que na maioria das vezes são canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina (TTXs), que possuem um baixo limiar de ativação e são rapidamente inativados. As fibras C expressam, ainda, canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (TTXr), cujo limiar de ativação é maior e cuja taxa de inativação é mais lenta, produzindo poucos (mas duradouros) potenciais de ação. Esse fenômeno leva ao aumento da eficiência sináptica do nociceptor, que é potencializada quando os canais TTXr são fosforilados por mediadores que induzem hiperalgesia. Além disso, durante o processo inflamatório pode ser observado aumento da expressão desses canais, o que parece ser um mecanismo indutor importante da hiperalgesia que acompanha essa resposta (Coutaux et al., 2005).

Atualmente, a abordagem mais comum no tratamento da dor causada por inflamação é a inibição ou redução da síntese de componentes da sopa inflamatória, responsáveis pelo desencadeamento deste processo nociceptivo. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os principais representantes desse tipo de tratamento, reduzindo a dor inflamatória e hiperalgesia ao inibir as enzimas cicloxigenase-1 (COX-1, presente de forma constitutiva) e cicloxigenase-2 (COX-2, cuja expressão é induzida por citocinas, fatores de crescimento e outros estímulos inflamatórios), envolvidas na síntese de prostanoídes. As prostaglandinas e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (coletivamente denominados prostanoídes) são formados quando o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado com uma cadeia de 20 carbonos, é liberado da membrana plasmática por fosfolipases e

metabolizado pelas COX (Ricciotti e Fitzgerald, 2011). Primeiramente ele é convertido em prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) e então a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), a partir da qual são formadas as prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ),  $D_2$  ( $PGD_2$ ),  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ),  $I_2$  ( $PGI_2$ ) ou  $TXA_2$ , dependendo do tipo de célula em que está ocorrendo o processo (Vergne-Salle e Beneytout, 2010).

Dentre esses produtos finais, a  $PGE_2$  e, em menor grau, a  $PGI_2$  são as isoformas mais importantes no processamento de sinais nociceptivos. Quatro receptores para a  $PGE_2$  foram identificados:  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$  e  $EP_4$ .  $EP_1$  está associado à mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular enquanto que os outros três são receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Kawabata, 2011). A ação da  $PGE_2$  em receptores  $EP_1$  ou  $EP_2$  é capaz de sensibilizar e/ou ativar fibras nociceptivas em questão de minutos ao induzir a produção de AMPc, o que leva à ativação de proteínas quinases A (PKA) e à consequente fosforilação de receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e à indução de correntes de  $Na^+$  ativadas por voltagem. A ativação desta cascata de sinalização acarreta no surgimento de hiperalgesia de origem inflamatória (Schaible, Ebersberger e Natura, 2011). O receptor  $EP_4$  também parece ser importante, pois inibidores seletivos para esta proteína demonstraram proeminente ação antinociceptiva em uma variedade de modelos de dor inflamatória (nocicepção induzida por CFA ou carragenina) e articular (Lin et al., 2006; Clark et al., 2008).

Ao afetar a produção de prostaglandinas, a maioria dos AINEs (assim como os corticoides e os bloqueadores de citocinas, que também afetam moléculas presentes na sopa inflamatória) previne a sensibilização dos nociceptores. Entretanto, outros medicamentos, como a dipirona, buscam reverter a sensibilização já instalada, possuindo, dessa forma, mecanismo de ação diferenciado quando comparados aos AINEs clássicos (Basbaum et al., 2009).

### 1.3. Dipirona

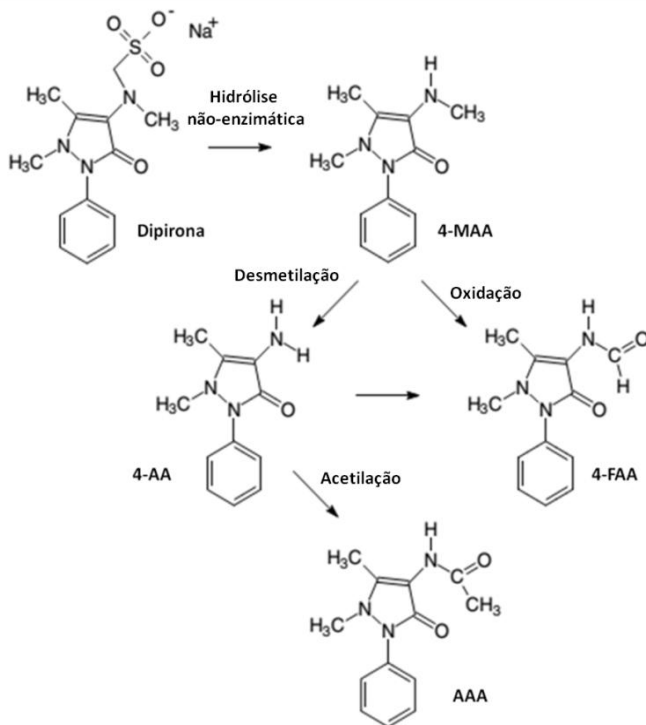
A dipirona, também conhecida como metamizol, é um analgésico não narcótico e antipirético derivado da pirazolona. Ela foi introduzida na prática clínica em 1922, com o nome comercial Novalgina®, e desde então é amplamente utilizada para estes fins tanto em crianças quanto em adultos. Nos Estados Unidos, Suécia, Canadá, Japão e Reino Unido sua prescrição foi proibida na década de 70 devido à possível correlação entre sua utilização e o aparecimento de agranulocitose. Tal fato fez com

que a dipirona fosse depreciativamente denominada “aspirina mexicana”, uma vez que o fármaco passou a ser contrabandeado pela fronteira entre México e Estados Unidos. No entanto, por causa do seu poder analgésico, antipirético, baixo custo e disponibilidade de formulação parenteral, o fármaco continua em uso em vários países europeus (Alemanha, Itália e Espanha, por exemplo), africanos e sul americanos incluindo o Brasil (Ergün et al., 2004; Benseñor, 2005; Bocca et al., 2007). No Brasil, a dipirona é um dos analgésicos mais utilizados, tanto na sua forma isolada (ex: Novalgina®, Anador®) quanto em associações (ex: Dorflex®, Neosaldina®) (Jornal Brasileiro de Medicina, 2012/2013).

A dipirona age como um pró-fármaco, não sendo encontrada na sua forma intacta no plasma após ser administrada oralmente. Em solução aquosa, ela passa por hidrólise espontânea, formando 4-metilamino-antipirina (4-MAA), o seu principal metabólito e que possui biodisponibilidade de 85%,  $t_{\max}$  de 1,2 a 2 h e  $t_{1/2}$  de 2,6 a 3,5 h. A 4-MAA formada é, então, absorvida e convertida em 4-formil-aminoantipirina (4-FAA) por oxidação e em 4-amino-antipirina (4-AA) por desmetilação, sendo ambas as reações hepáticas. A 4-AA pode, ainda, passar por uma reação de acetilação, formando a 4-acetil-amino-antipirina (AAA) (Zylber-Katz, Granit e Levy, 1992; Bocca et al., 2007; Rogosch et al., 2012) (Figura 1). Esses são os considerados os principais metabólitos da dipirona (todos predominantemente excretados pelos rins), sendo que o início e duração do efeito analgésico deste fármaco já foram correlacionados com as concentrações salivares da 4-MAA e 4-AA (Rohdewald, et al., 1983).

Inicialmente, a analgesia provocada pelo tratamento com esse fármaco foi atribuída à sua ação inibitória na síntese de prostaglandinas, o que fez com que surgissem comparações dos seus efeitos com aqueles obtidos após tratamento com AINEs, que bloqueiam a atividade das cicloxigenases através da competição com o ácido araquidônico pelo sítio ativo da enzima (Erol et al., 2012). De fato, vários estudos já demonstraram que a dipirona é capaz de reduzir a atividade enzimática da COX-1 e COX-2 em plaquetas (Abbate et al., 1989; Campos et al., 1999), provocar redução dose-dependente de tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) no fluido cérebro-espinhal de humanos (Levy et al., 1998) e causar analgesia em modelos nociceptivos onde há comprovada liberação de PGE<sub>2</sub> (importante mediador da inflamação, dor e febre), como na administração de carragenina na pata (Rezende et al., 2008). Entretanto, a maioria dos AINEs apresenta uma tríade de efeitos (analgésico, antipirético e anti-inflamatório), enquanto que a analgesia provocada

pela dipirona está associada com uma ação anti-inflamatória muito fraca (Tatsuo et al., 1994; Sauzem et al., 2009). Além disso, estudos demonstram que os metabólitos da dipirona afetam a ação das COXs de uma forma diferenciada, sendo que a 4-MAA inibe esta enzima através de um mecanismo dependente de ferro (resultando no sequestro de radicais necessários para iniciar o ciclo catalítico da COX), e tanto a 4-MAA quanto a 4-AA podem alterar o caminho da síntese de prostaglandinas em ensaios bioquímicos livres de células, onde há redução da produção de  $\text{PGE}_2$  e aumento da síntese de prostaglandina  $\text{F2}\alpha$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) e outras isoformas não identificadas (Pierre et al., 2007).



**Figura 1. Metabolismo da dipirona.** A dipirona passa por hidrólise não-enzimática, formando a 4-metilamino-antipirina (4-MAA), o seu principal metabólito. A 4-MAA é, então, absorvida e convertida a uma variedade de metabólitos. Os encontrados em maior quantidade no plasma são a 4-aminoantipirina (4-AA), 4-formil-aminoantipirina (4-FAA) e 4-acetil-aminoantipirina (AAA) (Adaptado de Feldmann, Zuehlke e Heberer, 2008).

Dessa forma, outros mecanismos de ação para esse fármaco passaram a ser investigados, sendo que uma das vias estudadas foi a da conversão da arginina em óxido nítrico (NO). Foi demonstrado que o efeito analgésico da dipirona intraplantar em um modelo de hiperalgesia mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> administrada na pata de ratos é reduzido pelo tratamento com inibidores da síntese de NO (L-NMMA) ou da ativação da via de sinalização do NO (azul de metileno) (Duarte et al., 1992). Da mesma forma, em 1996, Lorenzetti e Ferreira indicaram que a via arginina-NO em neurônios sensoriais primários contribui para a analgesia espinal e periférica induzida pela dipirona.

Outros estudos sugerem, ainda, que a dipirona provoca antinocicepção através da ativação de vias opióides localizadas na massa cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da rafe (NRM) e medula espinal. Resultados apontam que microinjeções de dipirona no NRM de camundongos inibem de forma dose-dependente o reflexo de retirada da cauda no modelo de *tail-flick* (Jones, 1996) e que microinjeções do fármaco no PAG reduzem a resposta de neurônios de espectro dinâmico amplo a estímulos nocivos aplicados nos seus campos receptivos (Vanegas et al., 1997). Os efeitos analgésicos de dipirona microinjetada no PAG são abolidos por naloxona (antagonista competitivo opióide não-seletivo) administrada no PAG, RVM (porção rostral da medula oblonga ventromedial) e medula espinal, indicando que o efeito antinociceptivo da dipirona é mediado por opióides presentes nessas estruturas (Vazquez et al., 2005). Já foi demonstrado, também, que a dipirona é capaz de potencializar a ação de opióides. A administração concomitante de doses sub-efetivas de morfina e dipirona produz efeito analgésico maior do que aqueles observados quando os fármacos são administrados sozinhos em doses analgésicas (Aguirre-Bañuelos e Granados-Soto, 1999; López-Muñoz et al., 2008).

O envolvimento do sistema endocanabinóide também já foi estudado, observando-se que o efeito analgésico provocado pela microinjeção de dipirona no PAG é reduzido pelo pré-tratamento com AM251 (antagonista seletivo do receptor canabinóide CB1) (Escobar et al., 2012). Esses resultados corroboram estudos que indicam que tanto a anandamida quanto o 2-acil-glicerol (2-AG) são metabolizados pela COX-2, sugerindo que a analgesia central provocada por inibidores dessas enzimas pode resultar do aumento dos níveis centrais de endocanabinóides (Telleria-Diaz et al., 2010; Kim e Alger, 2004). Entretanto, Schlosburg e colaboradores (2012) não observaram alterações na antinocicepção induzida por dipirona nos testes de placa quente e de retirada da cauda após tratamento com rimonabanto

(antagonista de receptor CB1) ou SR144528 (antagonista de receptor CB2).

Também já foi observada uma interação entre a dipirona e a atividade nociceptiva do glutamato no sistema nervoso central, na qual a primeira inibiu de forma significativa a hiperalgesia induzida pela administração intratecal (i.t.) do segundo em camundongos (Beirith et al., 1998; Siebel et al., 2004). Adicionalmente, há evidências que indicam que o uso crônico de dipirona aumenta de forma significativa os níveis de células positivas para serotonina no córtex e mesencéfalo de ratos (Genç et al., 2009), embora o efeito analgésico central da dipirona não tenha sido influenciado por antagonistas de receptores de serotonina (Godoy et al., 2004).

Embora a dipirona seja frequentemente associada aos AINEs típicos, ela parece possuir um perfil de ação diferente, pois não apresenta os mesmos efeitos que a indometacina (fármaco clássico pertencente à classe dos AINEs) em testes de nocicepção e de indução de febre. No teste da carragenina administrada na pata de ratos, por exemplo, a dipirona necessita de doses maiores do que a indometacina para atenuar o estado hiperalgésico (Lorenzetti e Ferreira, 1985). Em outro trabalho, a administração intraplantar do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (aranha armadeira) causa nocicepção que envolve a ativação de receptores de cininas B<sub>2</sub>, TRPV1, receptores de serotonina 5-HT<sub>4</sub> ou canais iônicos ácido-sensíveis (ASIC), sendo susceptível à ação da dipirona, mas não da indometacina (Gewehr et al., 2013). O mesmo é observado na febre induzida pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de agentes pirogênicos, onde a dipirona é capaz de atenuar o aumento de temperatura corporal induzido pela administração de fator pirogênico pré-formado (PFPF), interleucina-8 (IL-8) ou PGF<sub>2α</sub> em ratos, todos os quais são resistentes à ação antipirética da indometacina (Souza et al., 2002).

Dessa forma, a dipirona parece apresentar mecanismo de ação próprio e diferenciado, havendo necessidade de maiores estudos sobre a maneira pela qual induz antinocicepção e antipirese.

#### **1.4. Sistema endotelinérgico**

Ao final dos anos 1980, a compreensão crescente do papel das células endoteliais como componentes ativos na regulação da resistência vascular revelou que as mesmas produzem um fator constritor derivado do endotélio, mais tarde isolado de cultura de células endoteliais



provenientes de aorta suína e chamado de endotelina (Yanagisawa et al., 1988). As endotelinas (ETs) compreendem uma família de peptídeos composta por três isoformas (ET-1, ET-2 e ET-3), das quais a ET-1 é o membro mais representativo. Cada isoforma de endotelina é codificada por um gene distinto e constituída por 21 aminoácidos, além de duas pontes dissulfeto, uma cauda hidrofóbica e uma porção polar (Masaki, 2004; Miyauchi e Masaki, 1999; Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

Todos os isopeptídeos biologicamente ativos da família são sintetizados em duas etapas a partir de pré-pró-endotelinas específicas com cerca de 200 resíduos de aminoácidos cada. Primeiramente ocorre a clivagem sequencial por endopeptidases semelhantes à furina, formando intermediários sem ação biológica, as big-ETs (polipeptídeos de 37 a 41 aminoácidos). Em seguida, ocorre a clivagem desses compostos em seus sítios Trp-Val, para formar ET-1 ou ET-2, ou Trp-Ile, gerando ET-3. Esta última etapa do processamento é realizada por uma família de metaloproteases ligadas à membrana, conhecidas como enzimas conversoras de endotelinas (ECE). ECE-1 e ECE-2 têm preferência pela big-ET-1 quando comparados a big-ET-2 e big-ET-3 (Nussdorfer et al., 1999; Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

Embora as células endoteliais vasculares sejam as principais fontes de ET-1, os genes que codificam os três peptídeos são expressos, em graus variados, por uma ampla gama de células. Além das suas potentes ações vasoconstritoras, as ETs exercem efeitos em tecidos dos tratos respiratório, gastrointestinal, urogenital, e no sistema nervoso central e periférico, regulando processos fisiológicos, como fluxo sanguíneo, proliferação celular e transporte iônico. As ETs também estão envolvidas no desenvolvimento de fisiopatologias, incluindo aquelas que envolvem algumas formas de hipertensão, câncer, inflamação e dor (Rubanyi e Polokoff, 1994; Piovezan et al., 2000; Stow et al., 2011).

As ETs produzem seus efeitos biológicos através de interação com receptores específicos pertencentes à família dos GPCRs. Dois tipos de receptores de ET foram clonados em mamíferos: o receptor ET<sub>A</sub>, que apresenta maior afinidade (70-100 vezes) pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 (Arai et al., 1990); e o receptor ET<sub>B</sub>, que demonstra afinidade semelhante pelas três isoformas de endotelina (Sakurai et al., 1990), mas tem afinidade seletiva pela sarafotoxina S6c, uma toxina semelhante às ETs que faz parte da composição de veneno de serpente (Williams et al., 1991). A seletividade pelo ligante é determinada, principalmente, pelo segundo e quinto domínios trans-membrana do receptor (Barr et al, 2011) e já foi sugerida a ocorrência de modulação alostérica por certas moléculas, como no caso do ET<sub>A</sub>, cuja atividade

vasoconstritora é afetada pelo ácido acetil salicílico (AAS) e salicilato de sódio (metabólito do AAS) (Talbot et al., 2000).

O receptor  $ET_A$  é encontrado em abundância em células da musculatura lisa vascular, onde sinaliza o aumento dos níveis intracelulares de cálcio, causando uma contração duradoura. Já o receptor  $ET_B$  é predominantemente expresso em células endoteliais, onde estimula a liberação de NO com consequente relaxamento das células musculares lisas vasculares. Entretanto,  $ET_A$  também é encontrado em células endoteliais no tecido cardíaco, enquanto que, no estômago,  $ET_B$  está localizado em células musculares, sendo responsável pela sua contração. A co-expressão dos dois receptores já foi demonstrada em vários tipos celulares, como células musculares lisas, astrócitos, células epiteliais do plexo coróide e da pituitária anterior e células endoteliais cardíacas (Khodorova, Montmayeur e Struchartz, 2009a). Além disso, eles também se encontram expressos em neurônios e células gliais, incluindo astrócitos, microglia e células de Schwann não produtoras de mielina tanto no sistema nervoso central quanto periférico (Pomoni et al., 2001).

As consequências da estimulação dos receptores por ET-1 são complexas, pois várias vias de transdução de sinal podem ser ativadas. Tanto  $ET_A$  quanto  $ET_B$  são capazes de se acoplar a proteínas G sensíveis ( $G_{ai}$ ) ou insensíveis ( $G_{aq/11}$ ) à toxina pertussis, dependendo do tipo celular em que se encontram. A ligação de ET-1 com seu receptor resulta na dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  das proteínas G, iniciando, então, a cascata de sinalização. Ambos receptores parecem estar acoplados à ativação de fosfolipases C (PLC) e D (PLD) através da proteína  $G_{aq}$  (produzindo IP3), à inibição da adenilil ciclase através da proteína  $G_{ai}$  (reduzindo a síntese de AMPc) e à ativação da guanilil ciclase por NO (aumentando a produção de GMPc). Outras vias de sinalização também são moduladas pela ET-1, como o aumento dos níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$ , ativação de fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ), produção de NO, ativação de proteína quinase C (PKC) e ativação da via ras/raf/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Khodorova, Montmayeur e Strichartz, 2009a).

O complexo ET-1-receptor é praticamente indissociável e é internalizado logo após a sua formação. Os dois tipos de receptores são desensibilizados por fosforilação pela proteína quinase 2 acoplada à proteína G (GRK2), causando o desacoplamento do receptor da sua proteína G. Em seguida, ocorre a internalização através de vias dependentes de clatrina e, enquanto o  $ET_A$  é reciclado e retorna à

superfície da membrana plasmática, o ET<sub>B</sub> é conduzido aos lisossomos e degradado (Khodorova, Montmayeur e Strichartz, 2009a).

Um ano após a descoberta e isolamento da ET-1 por Yanagisawa e colaboradores (1988), Ferreira e colaboradores (1989) publicaram o primeiro artigo mostrando a participação da ET-1 na sensibilidade dolorosa. Este estudo pioneiro demonstrou que a administração de ET-1 induz hiperalgesia em ratos, contorções abdominais em camundongos, incapacitação articular em cães e sensações dolorosas e de prurido no antebraço de humanos.

Quando administrada na pata, a ET-1 induz comportamentos de lambida e elevação da pata que podem ser associados à nocicepção (Piovezan et al., 2000; Menéndez et al., 2003; Motta et al., 2009). Estudos eletrofisiológicos mostram que a ET-1 intraplantar (nas mesmas doses em que causa nocicepção) é capaz de estimular fibras C e Aδ em ratos através da ativação do receptor ET<sub>A</sub>, enquanto que fibras Aβ não respondem ao estímulo (Gokin et al., 2001). Quando aplicada em DRGs retirados de ratos, a ET-1 altera a ativação de correntes de sódio TTXr que induzem ativação de neurônios nociceptivos (Zhou, Davar e Strichartz, 2002) e, quando colocada em cultura de células semelhantes a neurônios, estimula a liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Zhou, Strichartz e Davar, 2001). Estes trabalhos corroboram resultados obtidos que indicam que receptores ET<sub>A</sub> são expressos em neurônios peptidérgicos e não-peptidérgicos de baixo calibre encontrados no DRG de ratos, coelhos e macacos (Pomonis et al., 2001). Já a ativação do receptor ET<sub>B</sub> em células suporte (células gliais e queratinócitos) tem efeito inibitório sobre essa excitação neuronal, liberando peptídeos opióides e ativando canais de potássio retificadores localizados em neurônios nociceptivos (Khodorova et al., 2002, 2003; Berti-Mattera et al., 2006).

Adicionalmente, injeções locais de ET-1 na pata de ratos são capazes de sensibilizar de forma lenta a outra pata, contralateral à administração do peptídeo. Este efeito é bloqueado por anestésicos locais aplicados no nervo ciático durante o período inicial de indução de nocicepção pela ET-1, demonstrando a importância da transmissão aferente e sugerindo que as ações periféricas de ET-1 podem levar à sensibilização central (Khodorova e Strichartz, 2010).

Além de provocar nocicepção *per se*, a ET-1 também induz a sensibilização da pata a outros estímulos. Pode ocorrer, por exemplo, redução do limiar para retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, o que é atenuado pelo pré-tratamento com antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> (fase inicial da hiperalgesia), do receptor do peptídeo associado ao gene da calcitonina CGRP1 (fase tardia da hiperalgesia), do receptor de

glutamato NMDA (ambas as fases) (Khodorova et al., 2009b) e por bloqueadores do receptor TRPV1 (Balonov, Khodorova e Strichartz, 2006). Já foi relatado que a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 administrada na pata de ratos e camundongos é mediada por ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, através da formação de AMPc e ativação da cascata de fosforilação induzida por PKC (da Cunha et al., 2004; Baamonde et al., 2004; Motta et al., 2009), além de envolver PLC, p38 MAPK, ERK1/2 e JNK (Motta et al., 2006). A nocicepção desenvolvida após administração de ET-1 é classificada como inflamatória, sendo que as endotelinas são consideradas mediadores hiperalgésicos finais, agindo de forma direta nos nociceptores através de seus receptores metabotrópicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (Ferreira et al., 1989; Zhou, Davar e Strichartz, 2002; Gokin, et al., 2001).

A depleção seletiva da expressão de ET<sub>A</sub> em neurônios sensoriais (mantendo a expressão gênica de ET<sub>A</sub> intacta em tecidos periféricos não neuronais e de ET<sub>B</sub> em todos os tecidos) é capaz de anular a hiperalgesia induzida por ET-1 apenas na fase tardia do fenômeno, mostrando que os eventos agudos envolvem tanto a ativação de ET<sub>A</sub> quanto de ET<sub>B</sub> expressos em células periféricas não neuronais (Stösser et al., 2010).

ET-1 administrada na pata também é capaz de provocar hiperalgesia térmica e química, ambas mediadas pelos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (Baamonde et al., 2004; Motta et al., 2009) e potencializar a algisia e edema induzidos por formalina e capsaicina (Piovezan et al., 1998; Piovezan et al., 2000). Na nocicepção induzida por capsaicina, baixas doses de ET-1 na pata induzem hiperalgesia mediada pelo receptor ET<sub>A</sub>, enquanto que doses maiores que 30 pmol/pata demonstram efeito anti-hiperalgésico, mediado por ET<sub>B</sub> (Piovezan et al., 1998).

Como foi demonstrado por da Cunha e colaboradores (2004), a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 não é susceptível à ação de anti-inflamatórios clássicos como a indometacina (AINE) e a dexametasona (corticosteróide). De forma similar, antagonistas de receptores endotelinérgicos apresentam efeito anti-nociceptivo em modelos animais onde os AINEs são ineficazes, como na neuralgia do trigêmeo (Chichorro et al., 2006).

A dipirona, entretanto, é capaz de afetar fenômenos induzidos pelo tratamento com ET-1. Em 2011, por exemplo, Malvar e colaboradores demonstraram que a febre induzida em ratos por ET-1 ou lipopolissacarídeo (LPS) proveniente de *E. coli* é bloqueada pelo tratamento sistêmico com dipirona. A indometacina, por sua vez, apesar de reduzir a febre induzida por LPS, foi incapaz de alterar a febre provocada por ET-1. O grupo demonstrou pela primeira vez na literatura

que o bloqueio da febre induzida pela ET-1 não está correlacionado com a inibição dos níveis de  $PGE_2$  no hipotálamo. As ETs estão entre os mais importantes mediadores centrais da resposta febril induzida pelo LPS, pois este fenômeno está associado com o aumento nos níveis de ET-1 no líquido cefalorraquidiano e o tratamento com BQ-788, um antagonista do receptor  $ET_B$ , é eficaz em reduzir a febre induzida por LPS (Fabricio et al., 1998; 2005).

Entretanto, apesar da abundância de estudos que investigam o mecanismo de ação da dipirona, não há artigos que avaliem a relação da atividade antinociceptiva desse fármaco e de seus metabólitos com o sistema endotelinérgico. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos da administração de dipirona e de seus principais metabólitos (4-MAA e 4-AA) em testes de nocicepção aguda e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-hiperalgésica da dipirona e de seus principais metabólitos, 4-metilamino-antipirina (4-MAA) e 4-amino-antipirina (4-AA), utilizando modelos de nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de agentes algógenos na pata de camundongos. Com o auxílio de técnicas de bioquímicas e de imunoenensaio, investigar os possíveis mecanismos envolvidos nesta atividade.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Investigar a atividade antinociceptiva da dipirona e seus metabólitos (4-MAA e 4-AA) nos testes de nocicepção aguda induzida por ET-1 ou formalina administradas na pata de camundongos;
2. Avaliar o efeito anti-edematogênico da dipirona e seus metabólitos (4-AA e 4-MAA) no edema induzido pela administração de ET-1 na pata de camundongos;
3. Avaliar a influência do tratamento com dipirona ou seus metabólitos (4-MAA e 4-AA) na hiperalgesia mecânica induzida pela administração de ET-1 na pata de camundongos;
4. Avaliar o papel da liberação de citocinas pró- (IL-1 $\beta$ ) ou anti-inflamatórias (IL-10) na nocicepção e hiperalgesia induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos e no efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da dipirona, 4-AA ou 4-MAA nestes testes;
5. Avaliar a participação da migração de células inflamatórias na nocicepção e hiperalgesia induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos e no efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da dipirona, 4-AA ou 4-MAA nestes testes.





### 3. MATERIAL

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, da variedade Swiss, provenientes do Biotério do Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, fase clara iniciada às 06:00 horas). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para manejo e investigação de dor experimental em animais de laboratório (Zimmermann, 1983). Os experimentos comportamentais foram realizados sempre durante a fase clara do ciclo e mediante aprovação dos protocolos experimentais pelo Comitê de Ética para uso de animais de laboratório (CEUA) da UFSC (Protocolo PP00668). Após os experimentos, os animais foram eutanaziados por inalação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).

#### 3.2. Reagentes, drogas e soluções

Foram empregados os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB; Sigma, St. Louis, EUA);
- 4-aminoantipirina (4-AA; Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- 4-metilaminoantipirina (4-MAA, pureza <99%) foi sintetizada conforme metodologia publicada em Aguiar et al. (2013) e gentilmente cedida pelo Dr. Giuliano Cesar Clososki, Centro de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- Albumina bovina sérica (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Álcool etílico absoluto (Lafan Química Fina Ltda, Várzea Paulista, SP);
- Aprotinina (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ; Nuclear, Diadema, SP);
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Nuclear, Diadema, SP);
- Dipirona hidratada (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Eosina amarelada (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);

- Fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF; Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Formaldeído solução (Nuclear, Diadema, SP);
- Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);
- Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);
- Glicose anidra (Lafan Química Fina Ltda, Várzea Paulista, SP);
- Hematoxilina modificada (Harris e Gill II) Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA);
- Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ; Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);
- Leupeptina (Millipore, Billerica, MA, EUA)
- Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);
- Parafina histológica granulada (Synth, Diadema – SP);
- Paraformaldeído puríssimo (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);
- Solução estéril de NaCl 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO);
- Solução salina tamponada com fosfato (0,01 M de tampão fosfato, 0,0027 M de cloreto de potássio e 0,137 M de cloreto de sódio, pH 7,4 a 25°C, *phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- UltraPure<sup>™</sup> EDTA (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA);
- Xilol (Synth, Diadema- SP).

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Experimentos comportamentais

#### 4.1.2. *Nociceção induzida por formalina*

O procedimento utilizado é similar àquele descrito originalmente por Hunskaar, Berge e Hole et al. (1985) e posteriormente modificado por Beirith e colaboradores (1998). Foi feita a administração subcutânea (s.c.) de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) diluída em PBS na região plantar da pata traseira direita. Animais controle foram tratados de modo idêntico com um volume similar de PBS. Imediatamente após a administração da formalina ou PBS, os animais foram recolocados em um recipiente de acrílico onde haviam sido previamente ambientados e o tempo despendido lambendo a pata injetada foi cronometrado em segundos (s) e utilizado como parâmetro comportamental indicativo de dor. Nestes experimentos, dois camundongos (controle e tratado) foram observados simultaneamente pelos 45 min que seguiram a injeção, e as respostas nociceptivas registradas no teste foram agrupadas em duas fases, uma inicial (neurogênica; até 5 min após a injeção) e outra final (inflamatória; de 15 a 45 min após a injeção).

Para garantir maior confiabilidade dos resultados, os experimentos foram filmados, com o auxílio de uma câmera acoplada a um computador portátil, para que pudessem ser analisados detidamente. Para reduzir a influência da presença da experimentadora na sala de testes sobre os animais em observação, a mesma permaneceu fora do ambiente de experimentação a maior parte do tempo.

#### 4.1.2. *Nociceção induzida por endotelina-1*

Cada camundongo recebeu 20 µL s.c. de ET-1 (10 pmol) ou PBS na região plantar da pata traseira direita. Imediatamente após o tratamento, os animais foram recolocados individualmente em um recipiente de acrílico onde haviam sido previamente ambientados e o tempo despendido (em s) lambendo a pata tratada foi registrado de forma cumulativa por 30 min (Piovezan et al., 1998) conforme descrito em 4.1.1.

#### 4.1.3. *Hiperalgesia mecânica induzida por endotelina-1*

Antes da aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados nas caixas de observação por pelo menos 2 h. Em seguida realizou-se uma sessão de seleção prévia dos animais, na qual cada um

foi submetido a dez aplicações consecutivas (em intervalos de cerca de 30 s) do filamento de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA) de 0,6 g no centro da superfície plantar da pata direita traseira do animal. As reações de retirada da pata em resposta a cada aplicação do filamento foram registradas e tomadas como respostas positivas. A porcentagem de respostas positivas às 10 aplicações do filamento foi considerada como indicativo da intensidade da nocicepção mecânica. Apenas animais que apresentaram até 30% de respostas positivas foram efetivamente incluídos nos grupos que receberam os diferentes tratamentos descritos abaixo (vide seção 4.5), e foram reavaliados quanto à sua intensidade de nocicepção mecânica aos 30 min e 1, 2, 3, 4 e 5 h após a injeção s.c. de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita.

#### **4.2. Determinação do edema de pata**

O edema de pata foi determinado nos animais utilizados nos experimentos de nocicepção induzida por ET-1 (vide seção 4.1.2). Trinta minutos após a administração de ET-1 ou PBS (ao final do período de observação) os animais foram eutanaziados por inalação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), em câmara apropriada, e as patas traseiras foram ambas seccionadas na altura da articulação do tornozelo. A intensidade do edema presente na pata direita (injetada com ET-1 ou PBS) foi estimada a partir da diferença de peso (em mg) entre a mesma e a pata contralateral não tratada. Um grupo de animais *naïve* (que não recebeu a aplicação de nenhum tipo de injeção) também foi avaliado nesse experimento.

#### **4.3. Quantificação dos níveis de citocinas**

Os níveis teciduais de IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) e IL-10 (interleucina-10) foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (2002), com algumas modificações. Os animais foram pré-tratados com dipirona, 4-AA, 4-MAA (50 mg/kg, i.p.) ou salina e receberam, 30 min depois, uma injeção de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita. Para avaliar a participação de citocinas anti- e pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo da dipirona e seus metabólitos na nocicepção aguda e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1, os camundongos foram eutanaziados por inalação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em câmara apropriada e a pele da porção inferior da pata traseira

direita foi coletada. As amostras referentes à nocicepção aguda foram coletadas 15 min após a injeção de ET-1 ou PBS e as referentes à hiperalgesia, 4 h depois. Os tempos de coleta foram determinados de acordo com o pico de ação da dipirona e seus metabólitos nos dois comportamentos nociceptivos aqui estudados.

Para o preparo das amostras, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato contendo Tween 20 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM, leupeptina 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina A 20 µg/mL. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi armazenado a menos 70°C até o momento da análise. Os níveis das citocinas foram determinados utilizando-se kits próprios de ELISA pelo método sanduíche (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Quantikine® ELISA Mouse IL-1 Imunoassay e Quantikine ELISA® Mouse IL-10 Imunoassay) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA). A dosagem de proteínas das amostras foi realizada utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e em seguida foi adicionado albumina bovina sérica (BSA 0,5%). Os resultados foram expressos em concentração de citocinas (pg) por miligrama de proteína.

#### 4.4. Análise de migração de células inflamatórias

##### 4.4.1. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A migração de neutrófilos para a pata traseira direita (onde foi feita a administração de ET-1) foi quantificada, indiretamente, através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de acordo com o método descrito por Ivey e colaboradores (1995). A MPO é uma enzima lisossomal com atividade peroxidase expressa mais abundantemente em neutrófilos, nas quais é encontrada em grânulos azurofílicos. Assim, a determinação da atividade dessa enzima seria uma quantificação indireta da migração de neutrófilos.

Nestes experimentos, 15 min ou 4 h após a administração de ET-1 ou veículo (tempos de coleta referentes à nocicepção e hiperalgesia, respectivamente), os camundongos foram eutanaziados por inalação de CO<sub>2</sub> e a pele das patas injetadas foi retirada, homogeneizada em tampão EDTA sódico 5% (pH 4,7) e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. O precipitado resultante foi suspenso em tampão 1 (NaCl 0,1 M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; EDTA sódico 0,015 M; pH 7,4) ao qual foi adicionado NaCl 0,2% seguido, após 30 segundos, de NaCl 1,6% mais glicose 5%. A nova solução foi centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4°C e o

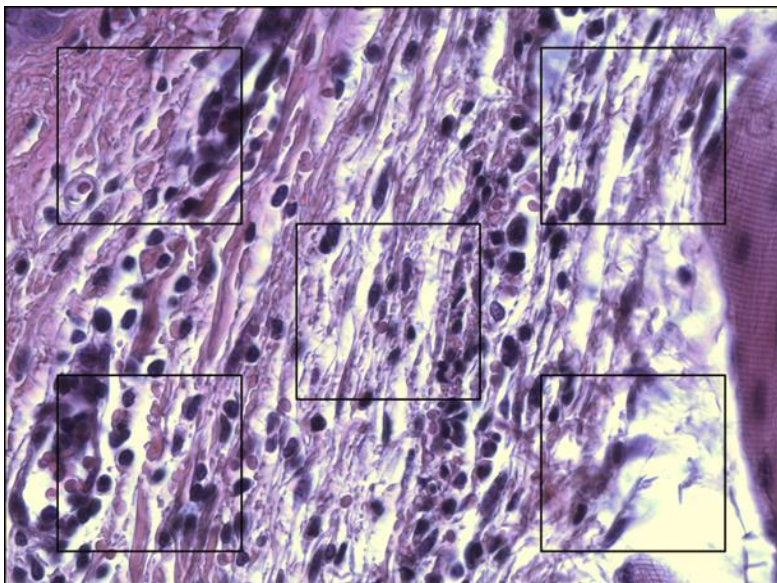
precipitado formado foi suspenso em tampão 2 ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,5 M e hexadeciltrimetilamônio (H-TAB) 5%; pH 5,4). As amostras assim obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido, sendo, então, novamente centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C. Alíquotas de 25  $\mu\text{l}$  do sobrenadante final foram utilizadas para o ensaio de atividade da MPO, no qual a reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  80 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 650 nm e os resultados expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

#### *4.4.1. Análise histológica*

Com a finalidade de confirmar os dados obtidos no ensaio da atividade de MPO, outros camundongos foram manipulados conforme a descrição inicial feita em 4.4.1. para obtenção de amostras da pele da pata injetada para avaliação histológica. Uma vez coletada, a pele da pata traseira injetada foi imersa em paraformaldeído (PFA) 4%. Após período de fixação de 24 h, as amostras foram transferidas para etanol 70%, onde permaneceram até o momento de processamento, quando foram desidratadas por imersões consecutivas em soluções com concentrações crescentes de etanol, até se chegar a etanol absoluto. Foram então transferidas para o xilol (substância miscível com o meio de inclusão), em uma etapa conhecida por diafanização ou clareamento, cujo objetivo é deixar as amostras translúcidas, e incluídas em parafina (i.e. emblocadas) em moldes retangulares, com o auxílio de um emblocador (modelo Leico EG1150H) e de uma placa fria (modelo Leica EG1150C). Os blocos de parafina foram seccionados em fatias de 7  $\mu\text{m}$  (micrótomo modelo Leica RM2255), que foram submetidas a um banho de gelatina (2 g/L de água a 49°C) e transferidas para lâminas.

A coloração foi feita pelo método hematoxilina-eosina, onde a hematoxilina cora estruturas basofílicas (como DNA nuclear e o RNA encontrado nos ribossomos e retículo endoplasmático rugoso) e a eosina, as acidofílicas (principalmente as proteínas citoplasmáticas), o que permite evidenciar as células inflamatórias, ainda que não distinguir seus tipos. Para contagem das células inflamatórias, três cortes histológicos de cada animal foram analisados e 5 campos microscópicos (400x) ao longo de cada corte foram selecionados, fotografados e suas imagens digitalizadas. Cinco quadrados foram distribuídos ao longo de cada campo fotografado (ver exemplo na Figura 2) e as células que apresentaram ao menos 50% da sua estrutura dentro da área delimitada foram contadas. O valor contabilizado em cada um dos cinco campos,

em cada corte, foi somado e a média dos três cortes foi calculada a fim de se obter o valor de células inflamatórias presentes na amostra de cada animal.



**Figura 2 - Imagem representativa de corte histológico de pele de pata traseira de camundongo, com delimitação de cinco campos para contagem de células.** Células que apresentaram ao menos 50% da sua estrutura dentro das áreas delimitadas foram contadas e o valor obtido para os cinco campos em cada corte foi somado. A média dos valores totais de células em cada um de três cortes foi calculada a fim de se obter o valor de células inflamatórias presentes na amostra de cada animal.

#### **4.5. Tratamentos**

Os tratamentos foram realizados através de três vias: sistêmica (intraperitoneal), local (subcutânea) ou central (intratecal). A Tabela 1 sintetiza as doses administradas de cada substância de acordo com a via utilizada.

**Tabela 1** Relação das doses administradas de dipirona, 4-AA ou 4-MAA e as vias de administração utilizadas.

Via de administração	Substância	Faixa de dose
<b>Intraperitoneal (i.p.)</b>	Dipirona	10-200 mg/kg
	4-aminoantipirina (4-AA)	10-150 mg/kg
	4-metilaminoantipirina (4-MAA)	25-150 mg/kg
<b>Subcutânea (s.c.)</b>	Dipirona	100-600 µg/pata
	4-aminoantipirina (4-AA)	100-200 µg/pata
	4-metilaminoantipirina (4-MAA)	100-300 µg/pata
<b>Intratecal</b>	Dipirona	5-100 µg/sítio
	4-aminoantipirina (4-AA)	1-100 µg/sítio.
	4-metilaminoantipirina (4-MAA)	100-200 µg/sítio

#### 4.5.1 Tratamento sistêmico – via intraperitoneal

Para administração sistêmica das substâncias a serem estudadas, foi utilizada a via intraperitoneal (i.p.). As injeções foram administrada no quadrante abdominal inferior esquerdo, 30 minutos antes da administração s.c. intraplantar de ET-1 (10 pmol) ou formalina 2,5% (0,92% formaldeído) na pata traseira direita.

#### 4.5.2 Tratamento local – via subcutânea

A administração das substâncias estudadas pela via s.c. na pata traseira direita de camundongos foi utilizada para avaliação do efeito local das substâncias administradas. O tratamento foi realizado 20 min antes da administração s.c. de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita de camundongos, sendo que 20 µL de cada substância foram administrados.

#### 4.5.3 Tratamento central – via intratecal

Com o objetivo de avaliar o efeito das substâncias estudadas no SNC, as mesmas foram administradas pela via intratecal (i.t.). O



tratamento foi realizado 15 min antes da administração s.c. de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita de camundongos, sendo que 5  $\mu$ L de cada solução foram administrados.

A técnica de injeção intratecal foi realizada conforme originalmente descrita por Hylden e Wilcox (1980), com algumas modificações. Um dia antes dos experimentos, os animais foram depilados na região dorsal posterior, próxima à cauda. Para aplicar a injeção, os animais conscientes foram contidos em um tubo de PVC e posicionados na beirada da bancada, de modo a permitir que a porção posterior de seu corpo fosse delicadamente flexionada para baixo, a fim de evidenciar a posição da coluna vertebral. O posicionamento do osso da pélvis foi localizado com os dedos indicador e polegar, para utilizá-lo como ponto de referência para a injeção, que foi aplicada com seringa de insulina de 0,3 mL e agulha de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre. A agulha foi introduzida no canal vertebral, na altura da linha do osso pélvico e no centro da linha que marcava a posição da coluna vertebral, de modo a alcançar o espaço entre os segmentos L5 e L6, onde um volume total de 5  $\mu$ L foi injetado. O sucesso da administração foi confirmado pela flexão da cauda do animal.

#### 4.6. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de grupos de 5 a 12 animais, exceto quando for devidamente especificado. Os dados brutos (frequência de resposta e tempo despendido lambendo a pata) obtidos durante o período de avaliação dos experimentos comportamentais foram utilizados para a análise estatística. Os resultados relativos à nocicepção declarada induzida por ET-1 10 pmol e para a resposta cumulativa à aplicação de formalina 2,5% foram analisados através do teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett (experimentos com formalina) ou Newman-Keuls (experimentos com ET-1). Para a análise dos dados de hiperalgesia mecânica e do decurso temporal da nocicepção induzida pela formalina foi feita análise pelo teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Os resultados relativos às dosagens de citocinas foram analisados através do teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls. Já os resultados referentes à determinação da atividade da enzima MPO e à contagem de células inflamatórias foram submetidos ao teste *t* de Student não-pareado. Todas as análises foram feitas com a ajuda do *software* GraphPad Prism®, versão 5, e diferenças

com valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 5. RESULTADOS

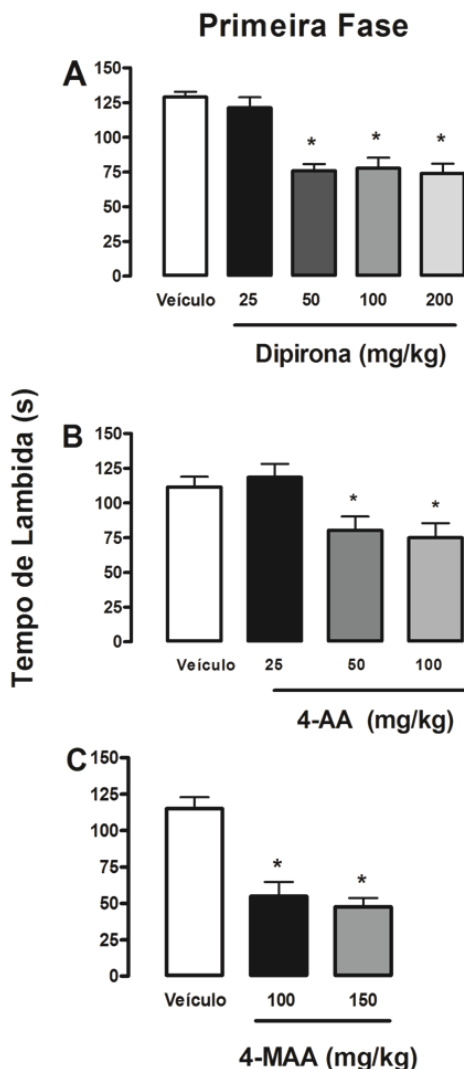
### 5.1. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na nocicepção induzida por formalina na pata de camundongos

O tratamento sistêmico prévio pela via i.p. com dipirona, 4-AA ou 4-MAA foi capaz de reduzir a nocicepção provocada pela administração de formalina 2,5% (formaldeído 0,92%) na pata traseira direita de camundongos.

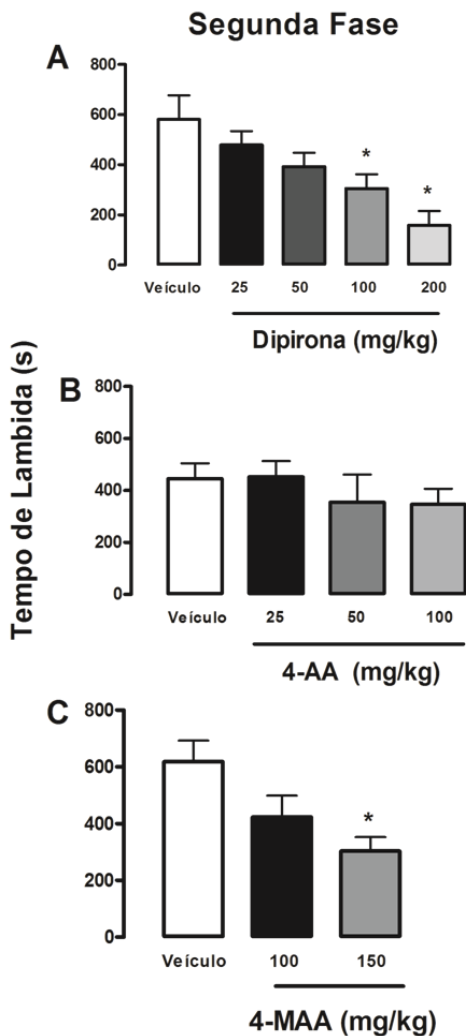
Tanto a dipirona quanto seus principais metabólitos foram capazes de reduzir a nocicepção observada durante a primeira fase da resposta nociceptiva à formalina (i.e. a que é indicativa de reação neurogênica e se manifesta nos primeiros 5 minutos). A dipirona (25, 50, 100 e 200 mg/kg) e a 4-AA (25, 50 e 100 mg/kg) surtiram efeitos semelhantes, promovendo inibição de  $41 \pm 4\%$  e  $34 \pm 7\%$  na dose de 50 mg/kg e  $37 \pm 6\%$  e  $30 \pm 10\%$  para a dose de 100 mg/kg, respectivamente (Figuras 3A e 3B). A 4-MAA também mostrou ação antinociceptiva, com uma inibição de  $52 \pm 8\%$  da resposta na dose de 100 mg/kg, efeito maior que o causado por dose igual de dipirona ou 4-AA (Figura 3C).

Em relação à segunda fase da nocicepção induzida por formalina, também conhecida como fase inflamatória e quantificada dos 15 aos 45 min após sua administração, apenas a dipirona e a 4-MAA apresentaram efeito antinociceptivo significativo nas doses mais elevadas testadas, com de inibição de  $86 \pm 1\%$  para a dose de 200 mg/kg da dipirona e de  $51 \pm 8\%$  para a dose de 150 mg/kg de 4-MAA (Figura 4).

Experimentos também foram realizados com a dose de 50 mg/kg de 4-MAA. Entretanto, não foi observado efeito antinociceptivo com essa dose e, como os valores obtidos se mostraram muito heterogêneos, esse bloco de dados foi removido por razões estatísticas.



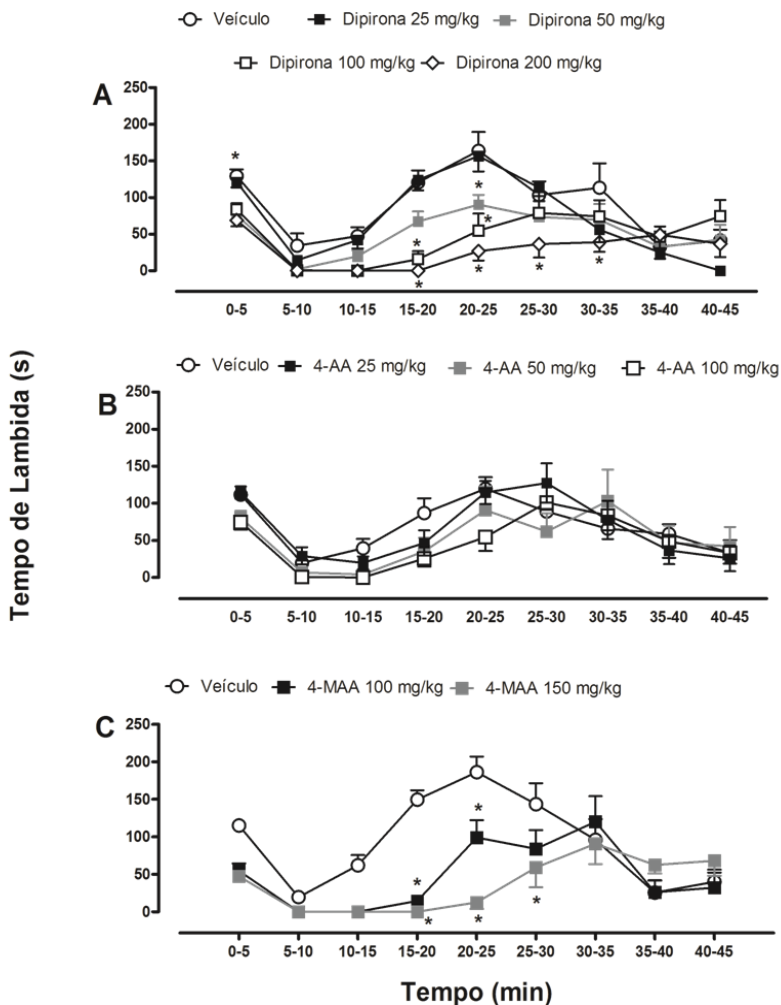
**Figura 3. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na primeira fase da 25-100 mg/kg, i.p.), 4-AA (B; 25-100 mg/kg, i.p.), 4-MAA (C; 100-150 mg/kg, i.p) ou salina injetados por via sistêmica 30 min antes da formalina 2,5% (0,92% formaldeído; s.c. na pata traseira direta). Os valores representam o tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira nos 5 min que sucederam a administração s.c. de formalina 2,5% (n= 7-9 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + formalina 2,5% (ANOVA de 1 via, seguida pelo Dunnet).**



**Figura 4. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na segunda fase da nocicepção induzida por formalina.** Efeito antinociceptivo da dipirona (A; 25-100 mg/kg, i.p.), 4-AA (B; 25-100 mg/kg, i.p.), 4-MAA (C; 100-150 mg/kg, i.p) ou salina injetados por via sistêmica 30 min antes da formalina 2,5% (0,92% formaldeído; s.c. na pata traseira direita). Os valores representam o tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira no período de 15-45 min após a administração s.c. de formalina 2,5% (n= 7-9 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + formalina 2,5% (ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de Dunnett).

Com o objetivo de verificar a ação das substâncias estudadas ao longo do desenvolvimento da nocicepção induzida por formalina, os dados cumulativos foram divididos ao longo dos 45 minutos de observação em períodos de 5 minutos (Figura 5). Representando os dados dessa forma é possível observar que apenas a dipirona mostrou-se eficaz na primeira fase nociceptiva do modelo, quando a dose de 200 mg/kg promoveu inibição de  $47 \pm 6\%$  (Figura 5A).

Já nos períodos que integram a segunda fase, tanto a dipirona quanto a 4-MAA foram capazes de induzir antinocicepção. Na maior dose testada, a dipirona teve efeito de 15 a 35 min após a administração de formalina, apresentando pico máximo de efeito aos 15 min (inibição de  $100 \pm 0\%$  na dose de 200 mg/kg) (Figura 5A). O efeito antinociceptivo da 4-MAA foi mais curto, iniciando-se aos 20 min (inibição de  $100 \pm 0\%$  na dose de 150 mg/kg) e durando até os 30 min (Figura 5C). A 4-AA, por sua vez, não foi capaz de reduzir a nocicepção ao longo do todo o período observado (Figura 5B). Estes resultados contrastam com aqueles observados na resposta cumulativa dos animais à formalina, onde todos os tratamentos foram capazes de reduzir as repostas durante a primeira fase da formalina, embora tenham confirmado que apenas a dipirona e o 4-MAA se mostrem eficazes na segunda fase (Figuras 3 e 4).



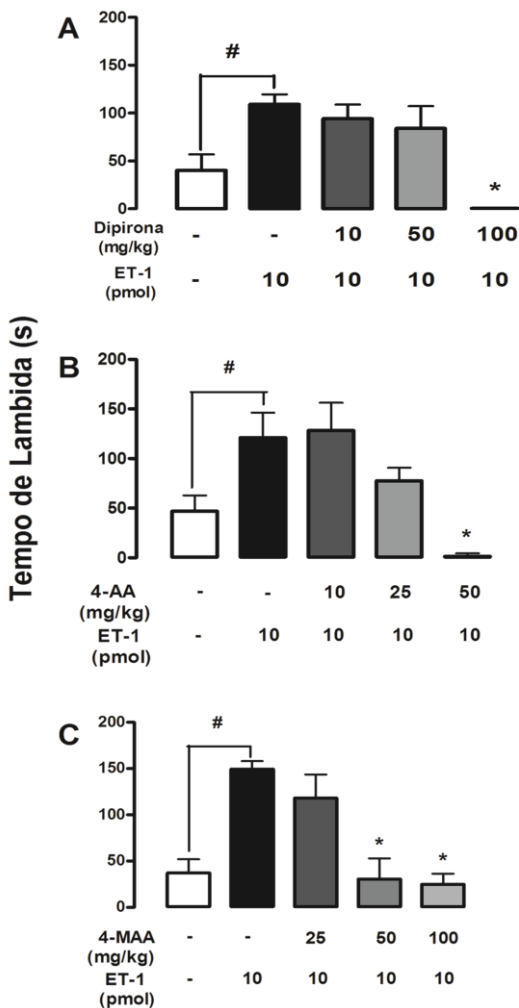
**Figura 5. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nociceção induzida por formalina.** Efeito antinociceptivo da dipirona (A), 4-AA (B), 4-MAA (C) ou salina injetada por via i.p. nas doses indicadas 30 min antes da injeção s.c. de formalina 2,5% na pata traseira direita. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira e estão divididos em blocos de 5 minutos até 45 minutos após a formalina. Os dados dos primeiros 5 minutos se referem à primeira fase da nociceção induzida pela formalina e os de 15 a 45 minutos, à segunda fase. Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao valor correspondente do grupo controle tratado com veículo (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

## **5.2. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na nocicepção e edema induzidos por ET-1 na pata de camundongos**

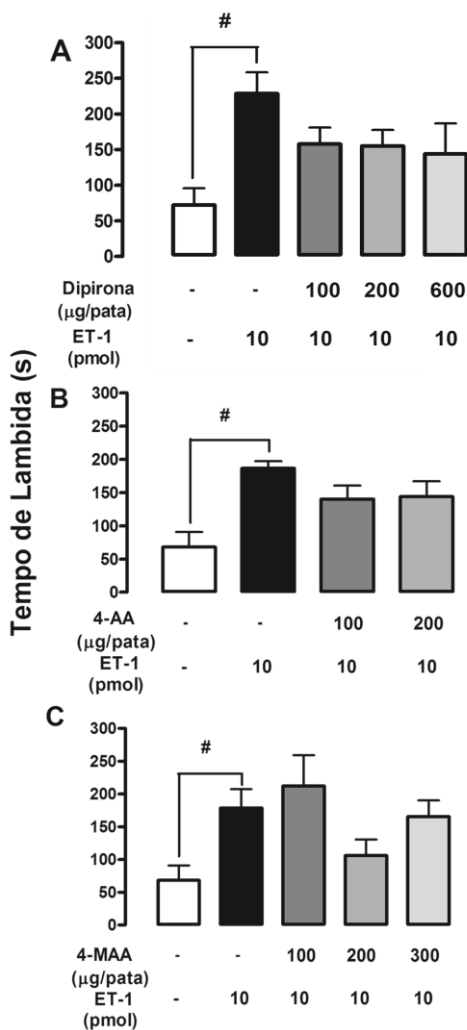
Quando administradas por via sistêmica (i.p.), nas doses de 10, 25, 50 ou 100 mg/kg, cada uma das três substâncias testadas foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida da pata promovida pela injeção local de ET-1 (10 pmol, s.c.) nas doses mais elevadas (Figura 6). Neste experimento é possível observar que a dipirona somente foi efetiva na maior dose testada (que suprimiu a resposta por completo; Figura 6A). Por outro lado, a 4-AA (10, 25 e 50 mg/kg) foi capaz de abolir por completo a resposta à ET-1 já na dose de 50 mg/kg (Figura 6B), enquanto a 4-MAA mostrou-se um pouco menos efetiva, pois nenhuma das doses testadas aboliu totalmente a resposta nociceptiva à ET-1 (inibição de  $75 \pm 12\%$  na dose de 100 mg/kg; Figura 6C).

Com o objetivo de verificar em qual nível (periférico ou central) as substâncias teste dipirona, 4-AA e 4-MAA estavam atuando para causar efeitos antinociceptivos, foi realizado o pré-tratamento pela via s.c. na pata traseira dos camundongos. Embora tenha havido uma tendência de redução do comportamento nociceptivo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o que recebeu apenas veículo, indicando que o efeito antinociceptivo obtido após tratamento sistêmico não é resultante de mecanismos locais (Figura 7).





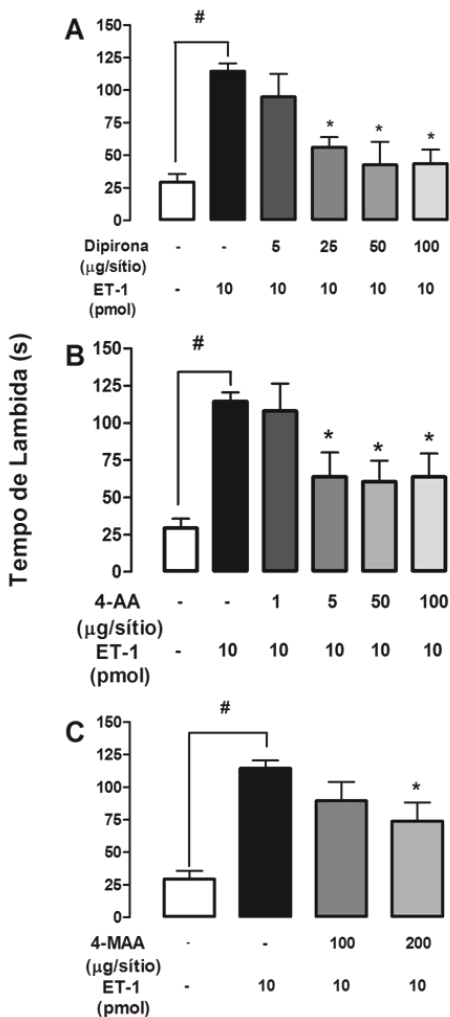
**Figura 6. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirone, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.** Efeito antinociceptivo da dipirone (A), 4-AA (B), 4-MAA (C) ou salina injetada por via i.p. nas doses indicadas 30 min antes da injeção s.c. de ET-1 (10 pmol) na pata traseira direita. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira nos primeiros 30 min após a administração de ET-1 ou PBS (n= 7-12 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p<0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p<0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + PBS (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



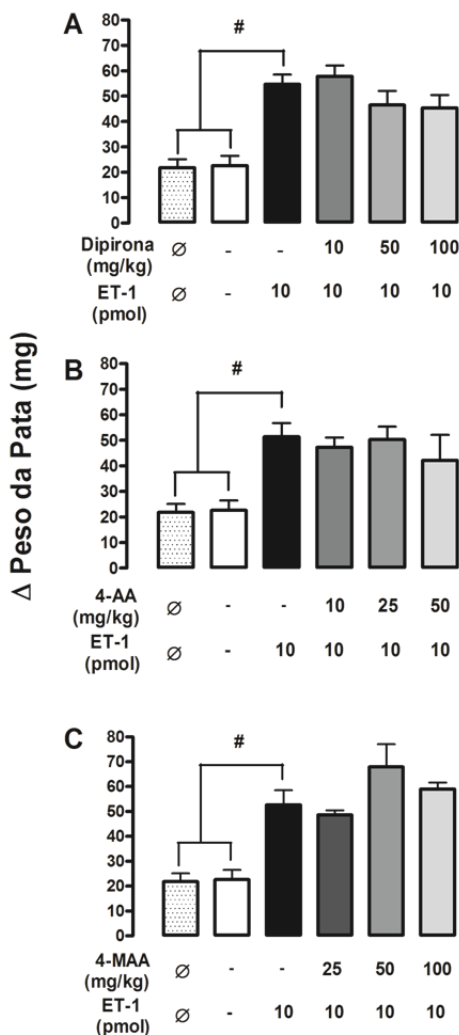
**Figura 7. Efeito do pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.** Efeito antinociceptivo da dipirona (A; 100-600 μg/sítio, s.c.), 4-AA (B; 100-200 μg/sítio, s.c.), 4-MAA (C; 100-300 μg/sítio, s.c.) ou salina injetados na pata por via s.c. 20 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). Os valores representam média ± E.P.M. do tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira 30 min após a administração s.c. de ET-1 ou PBS (n= 6-8 animais por grupo). Cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + PBS e não houve diferenças significativas dos grupos tratados com substancias teste em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Diante dos resultados dispostos nas Figuras 6 e 7, realizou-se o tratamento intratecal com as três substâncias teste (Figura 8). Após a administração central, todas elas apresentaram efeito antinociceptivo. A administração de 5 µg/sítio (dose intermediária da faixa de 1-100 µg/sítio utilizada) de 4-AA foi capaz de produzir inibição de  $44 \pm 14\%$ , semelhante ao resultado obtido após injeção de 25 µg/sítio de dipirona ( $51 \pm 7\%$ ). Entretanto, a maior inibição foi provocada pelas doses de 50 e 100 µg/sítio de dipirona, que causaram  $63 \pm 16\%$  e  $62 \pm 9\%$  de inibição, respectivamente (Figuras 8A e 8B). A 4-MAA também reduziu a nocicepção, mas de forma menos acentuada, atingindo  $35 \pm 13\%$  de inibição apenas após a administração da dose de 200 µg/sítio (Figura 8C).

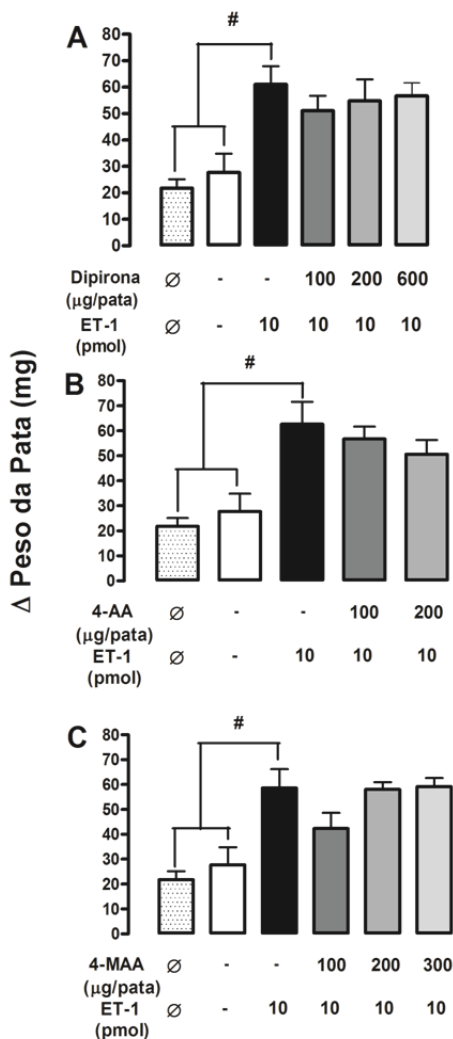
Para avaliar a ação anti-inflamatória da dipirona e seus metabólitos, ao final de cada experimento os animais foram eutanaziados e o edema da pata, medido. Os grupos que receberam apenas PBS pela via s.c. na pata não apresentaram edema maior do que o grupo de animais *naïve* (identificados nos gráficos pelo símbolo Ø), mas a injeção de ET-1 foi capaz de aumentar significativamente o volume da pata injetada. Entretanto, nenhuma dose de dipirona, 4-AA ou 4-MAA foi capaz de afetar o edema, independente da via de administração utilizada (Figuras 9, 10 e 11)



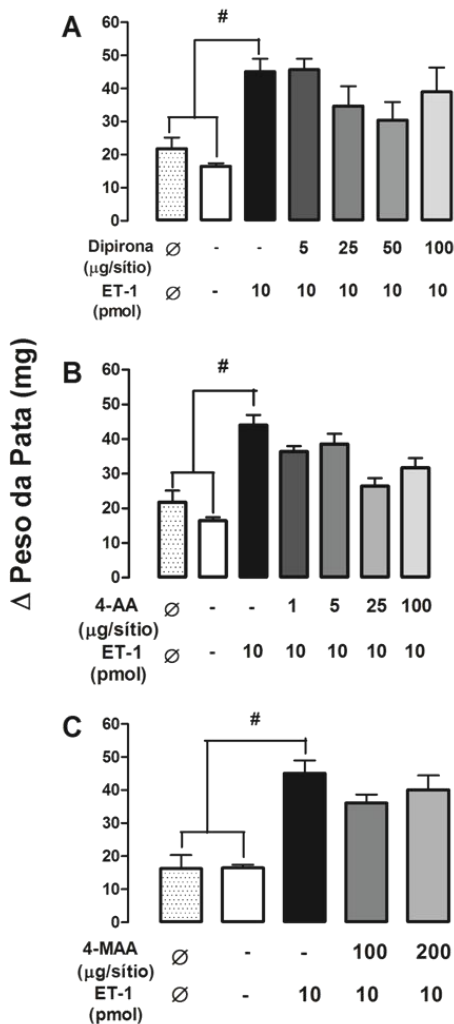
**Figura 8. Efeito do pré-tratamento central com dipirone, 4-AA ou 4-MAA na nocicepção induzida por ET-1.** Efeito antinociceptivo da dipirone (A; 5-100 µg/sítio, i.t.), 4-AA (B; 1-100 µg/sítio, i.t.), 4-MAA (C; 100-200 µg/sítio, i.t.) ou salina injetados na medula 15 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direta). Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo despendido, em segundos (s), pelos animais lambendo a pata traseira 30 min após a administração s.c. de ET-1 ou PBS (n= 6-8 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina+PBS (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



**Figura 9. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirone, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.** Dpirone (A; 10-100 mg/kg, i.p.), 4-AA (B; 10-50 mg/kg, i.p.), 4-MAA (C; 25-100 mg/kg, i.p) ou salina foram injetados por via sistêmica 30 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). O grupo de animais *naïve*, que não recebeu nenhuma injeção, está identificado pelo símbolo Ø. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da diferença de peso (em mg) entre as patas ipsi e contralaterais. Cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina+PBS (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



**Figura 10. Efeito do pré-tratamento local com dipirone, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.** Dpirone (A; 100-600 μg/sítio, s.c.), 4-AA (B; 100-200 μg/sítio, s.c.), 4-MAA (C; 100-300 μg/sítio, s.c.) ou salina foram injetados na pata por via s.c. 20 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). O grupo de animais *naïve*, que não recebeu nenhuma injeção, está identificado pelo símbolo Ø. Os valores representam a média ± E.P.M. da diferença de peso (em mg) entre as patas ipsi e contralaterais. Cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina+PBS (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



**Figura 11. Efeito do tratamento intratecal com dipirone, 4-AA ou 4-MAA no edema induzido por ET-1.** Dpirone (A; 5-100 μg/sítio, i.t.), 4-AA (B; 1-100 μg/sítio, i.t.), 4-MAA (C; 100-200 μg/sítio, i.t.) ou salina foram injetados na medula 15 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). O grupo de animais *naïve*, que não recebeu nenhuma injeção, está identificado pelo símbolo Ø. Os valores representam a média ± E.P.M. da diferença de peso (em mg) entre as patas ipsi e contralaterais. Cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina+PBS (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

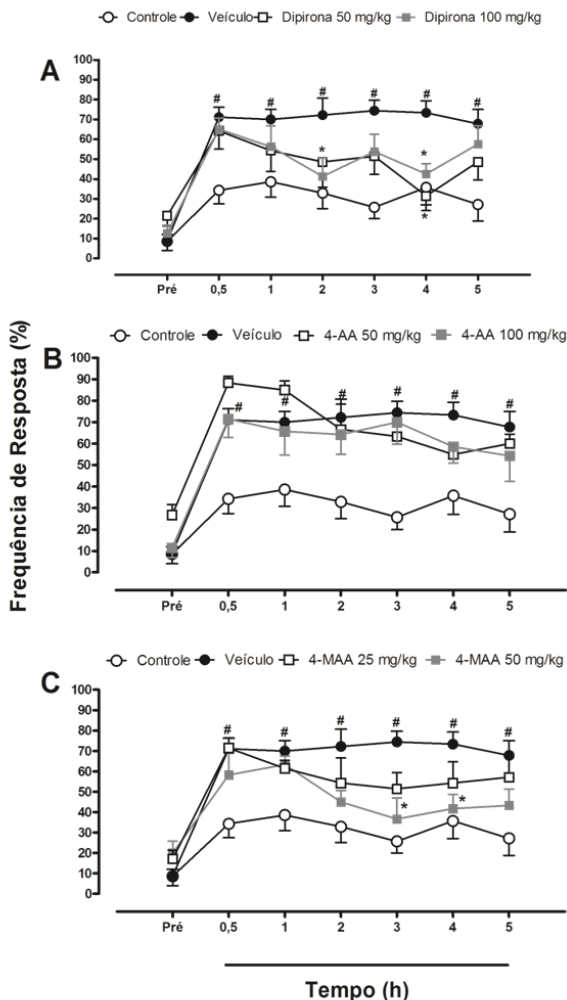
### **5.3. Efeito da dipirona e seus principais metabólitos na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 na pata de camundongos**

Tendo em vista que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da nocicepção aguda e da hiperalgesia são diferentes (Stein, Clark e Spencer, 2009; Delmas, Hao e Rodat-Despoix, 2011) e que a ET-1 também promove hiperalgesia após ser aplicada na pata (Balonov, Khodorova e Strichartz, 2006; Khodorova et al., 2009b; Motta et al., 2009), decidimos verificar se as três substâncias teste apresentariam perfis de ação anti-hiperalgésica contra a ET-1 semelhantes aos que apresentaram com relação às suas respectivas ações antinociceptivas frente ao peptídeo.

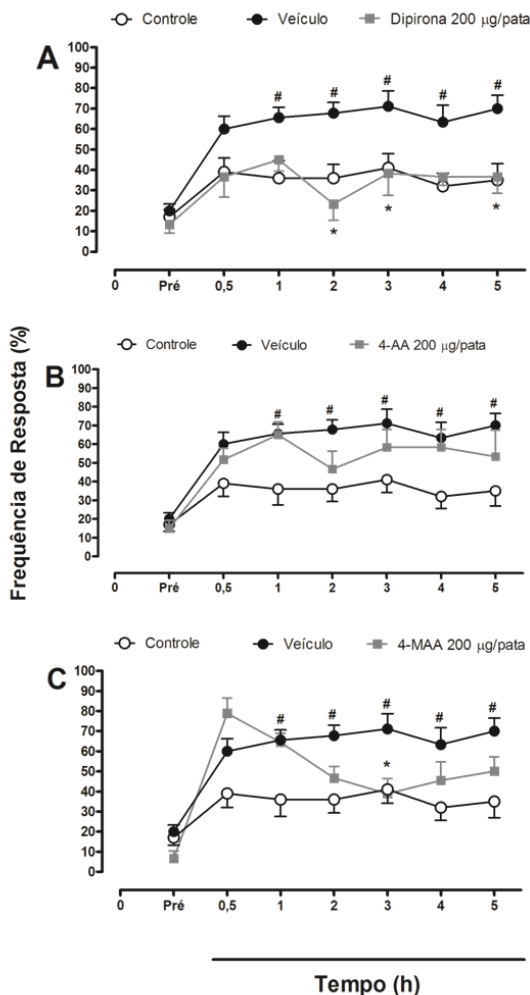
Após o tratamento prévio sistêmico (i.p.), apenas a dipirona e a 4-MAA foram capazes de atenuar a hiperalgesia mecânica induzida pela ET-1. Ambas as doses de dipirona testadas (50 e 100 mg/kg) reduziram significativamente a frequência de resposta à aplicação do filamento de von Frey 4 horas após a injeção de ET-1 (inibição máxima de  $57 \pm 10\%$  na dose de 50 mg/kg) e a dose de 100 mg/kg também apresentou efeito significativo 2 horas (Figura 12A). A 4-AA, entretanto, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica (Figura 12B). Por sua vez, a 4-MAA apresentou efeito antinociceptivo na dose de 50 mg/kg apenas, que se manifestou 3 e 4 horas após a injeção de ET-1, atingindo uma inibição de  $51 \pm 14\%$  na terceira hora (Figura 12C).

Com o objetivo de verificar se o mesmo perfil de ação encontrado na nocicepção aguda (onde as substâncias estudadas mostraram efeito central, mas não local) também seria observado na hiperalgesia mecânica, foram realizados tratamentos pela via local (s.c. na pata dos animais, 20 min antes da administração de ET-1) ou central (i.t., 15 min antes). Contrariamente ao que foi obtido com o tratamento local na resposta nociceptiva aguda, tanto a dipirona quanto a 4-MAA mostraram-se eficazes em promover efeitos anti-hiperalgésicos na dose de 200  $\mu\text{g/sítio}$ . A dipirona reduziu de forma global a resposta ao estímulo mecânico, mas só houve diferença significativa 2, 3 e 5 h após a ET-1 (inibição máxima de  $63 \pm 13\%$  no tempo de 2 h) (Figura 13A). Já a 4-MAA demonstrou efeito estatisticamente significativo apenas no tempo de 3 h, embora seja possível observar redução na frequência de resposta já 2 h depois da ET-1 (inibição de  $44 \pm 11\%$ ) (Figura 13C). Em contraste, o pré-tratamento local com 4-AA não surtiu efeito na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 (Figura 13B).

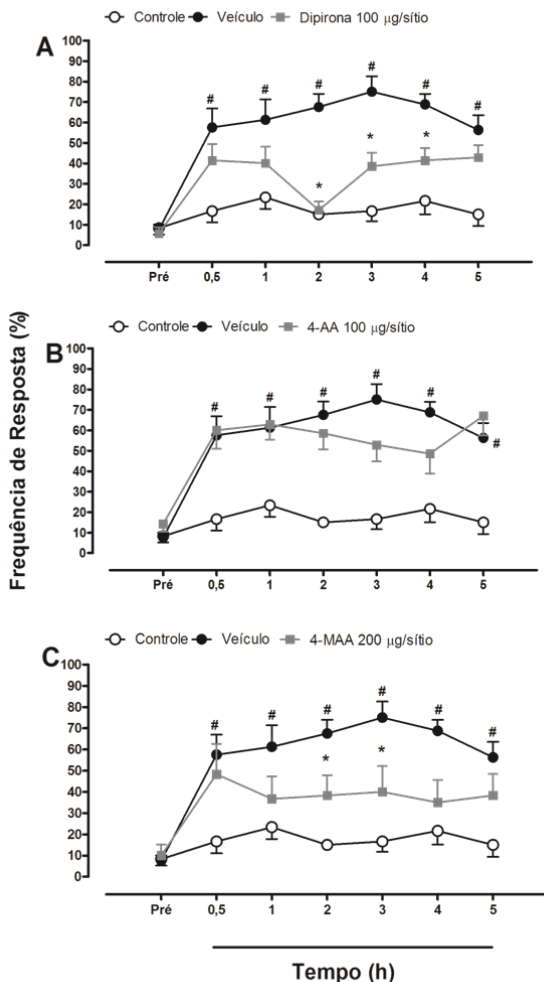




**Figura 12. Efeito do pré-tratamento sistêmico com dipirone, 4-AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1.** Dpirone (A; 50-100 mg/kg), 4-AA (B; 50-100 mg/kg), 4-MAA (C; 25-50 mg/kg) ou salina foram injetados por via i.p. 30 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da frequência de respostas (em %) frente a 10 aplicações de filamento de von Frey 0,6 g, sendo que comportamentos como retirada e agitação da pata foram considerados como indicativos de nocicepção (n= 7 a 8 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + PBS (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).



**Figura 13. Efeito do pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1.** Dpirona (A; 100-600 µg/sítio), 4-AA (B; 100-200 µg/sítio), 4-MAA (C; 100-300 µg/sítio) ou salina foram injetados na pata traseira direita por via s.c. 20 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na mesma pata). Os valores representam a média ± E.P.M. da frequência de respostas (em %) frente a 10 aplicações de filamento de Von Frey 0,6 g, sendo que comportamentos como retirada e agitação da pata foram considerados como indicativos de dor (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + PBS (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento central com dipirone, 4-AA ou 4-MAA na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1. Dipirone (A; 100 µg/sítio), 4-AA (B; 100 µg/sítio), 4-MAA (C; 200 µg/sítio) ou salina foram injetados por via intratecal na medula espinhal 15 min antes da ET-1 (10 pmol; s.c. na pata traseira direita). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da frequência de respostas (em %) frente a 10 aplicações de filamento de Von Frey 0,6 g, sendo que comportamentos como retirada e agitação da pata foram considerados como indicativos de dor (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + PBS (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni).

O mesmo perfil de resposta foi observado após o pré-tratamento pela via central, onde apenas a dipirona e a 4-MAA apresentaram efeito antinociceptivo. A dipirona (dose de 100 µg/sítio) foi capaz de atenuar a hiperalgesia mecânica a partir de 2 h após a administração de ET-1 (onde apresentou sua inibição máxima, equivalente a  $78 \pm 6\%$ ) e manteve este efeito até o tempo de 4 h, embora com porcentagem de inibição reduzida (Figura 14A). A 4-MAA (dose de 200 µg/sítio) também mostrou sua capacidade de reduzir a hiperalgesia mecânica 2 h após a administração da ET-1, mas manteve este perfil apenas até o período de 3 h, sendo que nos dois momentos a porcentagem de inibição foi muito semelhante (2 h:  $43 \pm 14\%$ ; 3 h:  $42 \pm 18\%$ ) (Figura 14 C). Em contraste, a 4-AA se mostrou, mais uma vez, ineficaz (Figura 14B)

### **5.1. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias na pele da pata de camundongos**

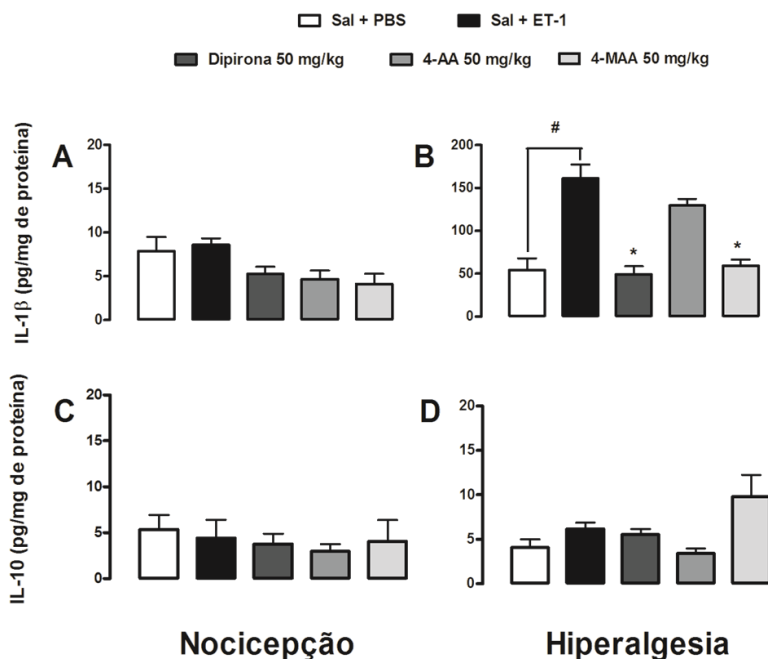
Vários artigos de revisão versam sobre a importância de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento de condições nociceptivas e sobre o papel de citocinas anti-inflamatórias no alívio da nocicepção (Zhang et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Diversos resultados apontam, também, que o sistema endotelinérgico está envolvido na nocicepção induzida pela administração intraplantar de citocinas exógenas em roedores (Verri et al., 2004 e 2005). Por isso, decidimos verificar se a liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 estaria envolvida na nocicepção e hiperalgesia induzidas por ET-1 e/ou no efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da dipirona e seus metabólitos.

A coleta da pele da pata dos animais foi realizada em dois momentos distintos: 4 h após a administração de ET-1 (momento no qual há hiperalgesia mecânica evidente) ou 15 min após a injeção do peptídeo (quando a ET-1 causa nocicepção, mas não hiperalgesia). Para avaliar o efeito da dipirona e seus metabólitos nos níveis dessa citocinas foi realizado o pré-tratamento sistêmico com as substâncias (todas na dose de 50 mg/kg pela via i.p., 30 min antes da injeção de ET-1).

Conforme pode ser observado na Figura 15B, foram observados aumentos nos níveis de IL-1 $\beta$  apenas no período de coleta representando a hiperalgesia mecânica, onde a ET-1 aumentou a concentração da citocina quando comparada ao grupo de animais que recebeu apenas veículo (PBS) na pata. Adicionalmente, tanto a dipirona quanto a 4-MAA reduziram os níveis de IL-1 $\beta$ , enquanto o pré-tratamento com 4-AA mostrou-se inefetivo. Esses dados complementam os resultados

referentes à hiperalgesia mecânica induzida por ET-1, onde a 4-AA também foi ineficaz (Figura 12).

Ensaio correspondentes foram realizados também para mensurar os níveis teciduais de IL-10. Contudo, nenhum dos tratamentos foi capaz de afetar as concentrações de IL-10, embora no grupo tratado com 4-MAA tenha havido uma tendência de elevação dos seus níveis (Figura 17B).

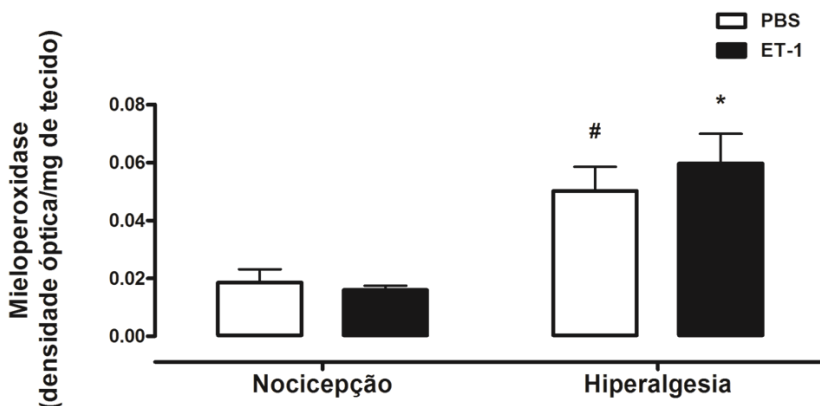


**Figura 15. Influência da dipirone, 4-MAA e 4-AA nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 na pele da pata de camundongos após injeção local de ET-1.** Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$  (A e B) e IL-10 (C e D) foram determinados na pele da pata de camundongos coletada 15 min (referentes à nocicepção; gráficos da esquerda) ou 4 h após administração de ET-1 (referentes à hiperalgesia; gráficos da direita). Três grupos foram pré-tratados com dipirone, 4-AA ou 4-MAA (50 mg/kg, i.p., 30 min antes da injeção de ET-1) para determinar a relação entre os níveis dessas citocinas e os efeitos antinociceptivos e hiperalgésicos dos fármacos. Valores representam a quantidade de citocinas (em pg) por mg de proteína (n = 4 animais por grupo). Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina + ET-1 e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo de animais administrado com salina+PBS (ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de Dunnet).

## **5.2. Análise da migração de células inflamatórias induzida por ET-1 na pata de camundongos**

Matzner, Drexner e Levy (1984) descreveram que a 4-MAA é capaz de reduzir a migração de leucócitos em soro humano ativado pela inoculação de zimosano, enquanto a 4-AA não apresenta esse efeito. Considerando esses dados, a migração de células inflamatórias na pata administrada com ET-1 foi avaliada com o intuito de verificar a participação desse fenômeno na nocicepção e hiperalgesia mecânica induzidas pelo peptídeo, além de analisar a participação dessas células nos mecanismos diferenciados de antinocicepção observados após administração de 4-MAA e 4-AA.

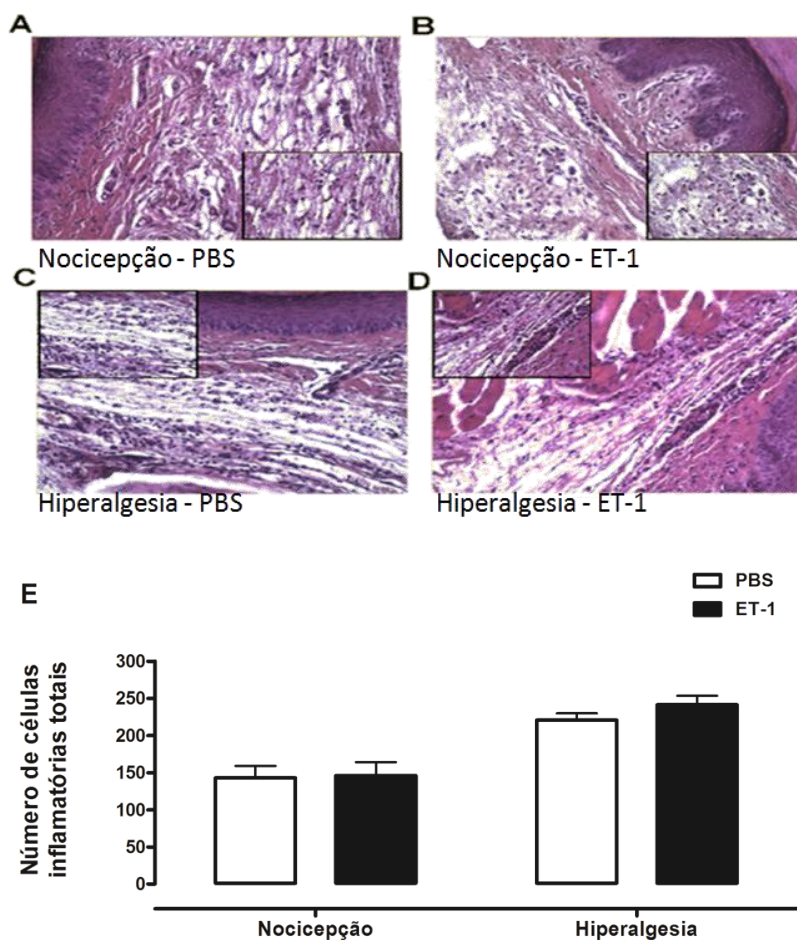
Ao quantificar a atividade da MPO (medida indireta da migração de neutrófilos), observou-se que 4 h após a administração de ET-1 (referente à hiperalgesia induzida pelo peptídeo) esta enzima apresentava atividade maior que a verificada em amostras coletadas 15 min após a injeção do peptídeo (relativo ao efeito nociceptivo do peptídeo). Entretanto, a magnitude do aumento da atividade de MPO observado 4 h após a injeção local de ET-1 foi semelhante ao provocado apenas pela administração do veículo (Figura 15). Como mostrado nas Figuras 11 e 12, o PBS sozinho não é capaz de induzir hiperalgesia mecânica, o que impossibilita o estabelecimento de uma relação entre a hiperalgesia e a migração de neutrófilos na pata de camundongos, pelo menos quando se utiliza como parâmetro de avaliação a atividade da MPO.



**Figura 16. Efeito da administração de ET-1 (10 pmol) ou PBS na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata de camundongos.** Avaliação da atividade da enzima MPO na pele da pata traseira direita de camundongos coletada 15 min (resultados relativos à nocicepção) ou 4 h (resultados relativos à hiperalgesia mecânica) após a administração de ET-1 (10 pmol) ou PBS. Valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da densidade óptica mensurada por mg de tecido analisado. Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com ET-1 e cujo tecido foi coletado 15 min após a administração do peptídeo e cerquilhas denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com PBS e cujo tecido foi coletado 15 min após a administração do veículo (teste  $t$  de Student bicaudal para amostras não pareadas).

Para confirmar os dados da determinação da atividade da MPO foi realizada análise histológica da pele da pata dos animais por coloração com hematoxilina-eosina. A quantificação das células observadas por microscopia não revelou qualquer relação evidente entre a administração de ET-1 na pata e o aumento da migração de células inflamatórias para a pele da mesma (Figura 16). Entretanto, enquanto que no experimento da MPO a análise estatística apontou um aumento na atividade da enzima 4 h após a injeção de ET-1 ou PBS quando comparado ao período de coleta de 15 min, a mesma diferença não foi observada na contagem de células.

Dessa forma, não foi possível determinar uma relação entre a migração de células inflamatórias e a nocicepção e hiperalgesia mecânica provocada pela administração de ET-1 na pata de camundongos.



**Figura 17. Efeito da administração de ET-1 (10 pmol) ou PBS na migração de células inflamatórias na pata de camundongos.** Análise realizada em cortes longitudinais da pele da pata de camundongos 15 min após a administração de PBS (A) ou ET-1 (B; resultados relativos à nocicepção) ou 4 horas após a administração de PBS (C) ou ET-1 (D; resultados relativos à hiperalgesia). O painel E representa a quantificação das imagens. Coloração hematoxilina-eosina; aumento de 200x e destaques em 400x (teste t de Student).



## 6. DISCUSSÃO

Introduzida na prática clínica em 1922, a dipirona ainda é utilizada em diversos países, como o Brasil, Alemanha, Itália e Espanha. Entretanto, apesar de fazer parte do arsenal farmacológico da medicina mundial há mais de 90 anos, o seu mecanismo de ação analgésico ainda não foi completamente elucidado. Neste trabalho apresentamos evidências de que a dipirona e seus principais metabólitos são capazes de atenuar a nocicepção aguda e a hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1, um peptídeo envolvido no desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória decorrente de lesão tecidual, bem como daquela associada à anemia falciforme, ao câncer ou de características neuropáticas (Khodorova, Montmayeur e Strichartz, 2009a).

Com o objetivo de comparar os efeitos anti-inflamatórios da dipirona, 4-AA e 4-MAA com as suas ações antinociceptivas não relacionadas à inflamação foi realizado o teste da formalina. Este teste, inicialmente descrito para uso em ratos e gatos por Dubuissou e Dennis (1977) e validado para camundongos por Hunskaar, Berge e Hole (1986), possibilita avaliar a intensidade da resposta comportamental do animal a um estímulo nociceptivo moderado e contínuo de origem química. A administração subcutânea da formalina diluída produz comportamentos de lambida e mordida da pata injetada que são facilmente identificáveis e reproduzíveis (Rosland et al., 1990; Tjølsen et al., 1992).

A primeira fase da resposta nociceptiva à formalina se inicia imediatamente após a administração, durando de 3 a 5 min. Ela ocorre por estimulação direta dos nociceptores, evocando a atividade de fibras C e Aδ (Porro e Cavazzutti, 1993). Esta fase é seguida por outra de relativa quiescência comportamental, que dura de 10 a 15 minutos, a partir da qual se inicia a segunda fase da resposta nociceptiva (Tjølsen et al., 1992). Esta resposta bifásica é acompanhada de alterações de parâmetros cardiovasculares (aumento da pressão arterial e frequência cardíaca) e por um disparo bifásico de neurônios do DRG (Abbadie, Brown e Mantyh, 1996). Contrariamente ao que é observado na primeira fase, os AINEs são eficazes na redução do comportamento nociceptivo apresentado na segunda fase, o que reforça a natureza diferenciada desses dois períodos de resposta induzidos pela formalina (Hunskaar, Berge e Hole, 1986). Experimentos mostram que processos inflamatórios periféricos estão envolvidos na segunda fase, bem como a sensibilização de neurônios do DRG induzida pela primeira fase, pois a administração de um anestésico local no sítio de injeção da formalina

após a primeira fase é capaz de prevenir o desenvolvimento da segunda (Tjølsen et al., 1992; Abbadie et al., 1996).

Neste trabalho, a resposta comportamental dos animais à aplicação de formalina foi avaliada de duas maneiras: de forma cumulativa ou na forma de decurso temporal (ponto a ponto). Quando avaliada cumulativamente, a nocicepção observada na primeira fase da formalina foi reduzida pelas três substâncias estudadas (dipirona, 4-MAA e 4-AA), mas apenas a dipirona e 4-MAA (em suas doses mais altas) foram capazes de produzir efeito antinociceptivo na segunda fase. Esses resultados corroboram dados da literatura que afirmam que o mecanismo de ação da dipirona é diferente daquele exibido pelos AINEs (Tatsuo et al., 1994; Shimada, Otterness e Stitt, 1994; Camu e Vanlersberghe, 2002), já que estes últimos são eficazes apenas na segunda fase do teste da formalina. Como a dipirona e seus principais metabólitos apresentaram melhor eficácia na primeira fase (neurogênica), a partir destes dados seria possível afirmar que essas substâncias teriam fraca ação anti-inflamatória e que seu efeito analgésico não estaria diretamente relacionado à modulação de componentes inflamatórios.

Entretanto, a análise do decurso temporal das respostas comportamentais em períodos consecutivos de 5 min sugere um cenário distinto. Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que apenas a dipirona foi eficaz na primeira fase e que na segunda tanto a dipirona quanto a 4-MAA mostraram ação antinociceptiva, enquanto que a 4-AA mostrou-se desprovida de efeito. Apesar de ser observada uma tendência à redução do comportamento nociceptivo pelas doses de 100 e 150 mg/kg de 4-MAA nos primeiros cinco minutos de observação (primeira fase), a redução não foi estatisticamente significativa (ANOVA de 2 vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni).

De fato, os resultados encontrados na literatura em relação à ação da dipirona no teste da formalina são contraditórios. Foi descrito que a administração i.p. de dipirona afeta as duas fases do teste (Beirith et al., 1998; Muñoz et al., 2010) ou apenas a segunda fase (Abbott e Hellemans, 2000). Diferenças também são observadas em relação à via de administração do fármaco. Beirith e colaboradores (1998) relataram que o tratamento s.c. na pata (local) com dipirona, a exemplo do intracerebroventricular (i.c.v.) ou i.t., reduz ambas as fases da resposta nociceptiva, enquanto outros afirmam que pela via s.c., o fármaco inibe apenas a segunda fase (Aguirre-Bañuelos et al., 1999) ou nenhuma delas (Abbott e Hellemans, 2000). É importante ressaltar que em todos os

estudos citados acima o efeito da dipirona foi analisado na forma cumulativa, como mostrado aqui nas Figuras 3 e 4.

Dessa forma, é difícil utilizar somente os resultados do teste da formalina para afirmar que a antinocicepção induzida pela dipirona e seus metabólitos está associada apenas à interação com substâncias inflamatórias. Além disso, trabalhos sugerem que outros componentes (não diretamente ligados à inflamação) também estão envolvidos na segunda fase do teste da formalina. Diversos fármacos que não são considerados analgésicos clínicos reduzem o efeito da formalina (para revisão, vide Porro e Cavazzutti, 1993), e há resultados que apontam que bloqueio e/ou a modulação de canais de sódio ativados por voltagem são capazes de atenuar a segunda fase do teste (Blackburn-Munro, Ibsen e Erichsen, 2002; Akada et al., 2006; Bai et al., 2007). Sabe-se, também, que os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina na sua fase inflamatória são intensificados pela administração i.t. de agonistas de canais de cálcio e reduzidos pelo pré-tratamento com quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  ou com inibidores de seus canais (Coderre e Melzack, 1992). Como artigos sugerem que a dipirona é capaz de modular a atividade de canais de potássio (Alvez e Duarte, 2002; Ortiz, Castañeda-Hernández e Granados-Soto, 2003; Valenzuela et al., 2005), é possível que este analgésico consiga interagir com outros canais iônicos e que seu efeito antinociceptivo na segunda fase do teste da formalina esteja ligada a esta interação.

Entretanto, apesar da interpretação conflitante dos resultados obtidos no teste da formalina (relativos à nocicepção), a ausência de efeito anti-edematogênico da dipirona, 4-AA e 4-MAA (em todas as vias de administração) no edema induzido por injeção s.c. de ET-1 na pata (Figuras 9, 10 e 11) sugere que o mecanismo de ação das substâncias estudadas não está fortemente relacionado à inflamação. A dipirona também não afeta o edema provocado na pata de roedores por formalina (Beirith et al., 1998) ou CFA (Milano et al., 2008; Sauzem et al., 2009; Maciel et al., 2013).

Contudo, apesar da ausência de efeito anti-edematogênico, a dipirona e seus principais metabólitos foram capazes de exercer ação antinociceptiva quando administrados por via sistêmica (i.p.) 30 min antes da injeção de ET-1 na pata. De acordo com os dados mostrados na Figura 6 é possível afirmar que a 4-AA é mais importante do que a 4-MAA para o efeito da dipirona neste teste, já que, quando administradas em doses semelhantes, a 4-AA acarretou inibição maior do comportamento nociceptivo do que o outro metabólito.

Com o objetivo de esclarecer em que níveis a dipirona, 4-AA e 4-MAA estariam atuando para promoção de seus efeitos antinociceptivos, foram realizados experimentos envolvendo a sua administração pelas vias local (s.c.) ou central (i.t.).

Quando administradas localmente na pata dos animais nenhuma das substâncias foi capaz de atenuar a nocicepção induzida por ET-1. As endotelinas (exógenas ou liberadas pelo próprio tecido) têm efeitos diretos e nociceptivos em neurônios sensoriais periféricos, pois a instilação de ET-1 sobre fibras sensoriais do tipo C ou A $\delta$  do nervo ciático provoca o disparo desses neurônios, o que é bloqueado pela co-administração de BQ-123 (antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub>) (Gokin et al., 2001). Já foi demonstrado, também, que a aplicação epineural de ET-1 no nervo ciático induz comportamento nociceptivo na pata de ratos (Davar et al., 1998).

Acredita-se que o efeito das endotelinas nos nociceptores seja principalmente mediado pelos receptores ET<sub>A</sub>, pois este subtipo está presente principalmente nas fibras sensoriais peptidérgicas e não-peptidérgicas de pequeno diâmetro. Já os receptores ET<sub>B</sub> encontram-se em sua maior parte em células satélite do DRG e em células de Schwann não-produtoras de mielina (Pomonis et al., 2001). Assim, é possível afirmar que no teste de nocicepção aqui estudado a administração de ET-1 na pata de camundongos leva à ativação de receptores ET<sub>A</sub> presentes nas fibras nociceptivas periféricas, causando a redução no limiar para ativação de canais de Na<sup>+</sup> TTXr (Zhou, Davar e Strichartz, 2002) e provocando o aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> no DRG, o que contribui para o aumento da excitabilidade dos nociceptores (Zhou, Davar e Strichartz, 2001).

Dessa forma, se a dipirona, a 4-AA e a 4-MAA administradas na pata 20 min antes da injeção de ET-1 não foram capazes de atenuar o comportamento nociceptivo, dificilmente o efeito observado após administração sistêmica está relacionado com a interação direta dessas substâncias com o sistema endotelinérgico ou com as vias intracelulares desencadeadas localmente pela ativação do receptor ET<sub>A</sub>.

Em contraposição, o tratamento prévio pela via i.t. mostrou ação antinociceptiva, indicando que a dipirona e seus principais metabólitos apresentam ação central. Mais uma vez, a 4-AA parece contribuir mais para a ação da dipirona do que a 4-MAA, já que a menor dose eficaz deste metabólito (5  $\mu$ g/sítio) foi 40 vezes menor do que a observada com 4-MAA (200  $\mu$ g/sítio). O tratamento pela via i.p. já havia demonstrado uma maior importância da 4-AA do que da 4-MAA na atenuação da nocicepção induzida por ET-1, mas não na mesma magnitude observada

com o tratamento pela via central. É possível que esta diferença seja decorrente de uma maior dificuldade de acesso da 4-AA ao SNC, o que prejudicaria o seu efeito após uma aplicação sistêmica. Além disso, como os metabólitos da dipirona (incluindo a 4-AA) são formados a partir da 4-MAA (Figura 1) é natural assumir que após um tratamento com dipirona a 4-MAA esteja presente em maior quantidade no organismo do que as outras substâncias resultantes da metabolização do fármaco. Isso explicaria por que nos tratamentos pelas vias i.p. ou i.t. a dose mínima efetiva da dipirona tenha sido maior do que a da 4-AA, já que a metabolização priorizaria a formação de 4-MAA e não resultaria em uma concentração apropriada de 4-AA no sítio de ação, o que afetaria o efeito da dipirona.

É possível que este efeito central das substâncias esteja relacionado com a capacidade da dipirona de atenuar a nocicepção provocada pela injeção i.t. de glutamato (Beirith et al., 1998; Siebel, Beirith e Calixto, 2004). O glutamato é um neurotransmissor crítico à propagação de informação neuronal em sinapses excitatórias na medula espinhal e para a criação e manutenção de hipersensibilidade espinhal relacionada à dor (*wind-up*), o que ocorre através da ativação de seus receptores (Tao, Gu e Stephens, 2005). Quando os terminais centrais (proximais) das fibras C e A $\delta$  são estimulados pela propagação de um potencial de ação ocorre liberação de uma variedade de neurotransmissores na lâmina I do corno dorsal da medula espinhal, sendo o glutamato um dos mais importantes para a transmissão e processamento do sinal nociceptivo. Como consequência, ocorre a ativação de receptores NMDA localizados no neurônio pós-sináptico, o que aumenta a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular e ativa segundo mensageiros e vias dependentes de cálcio, levando à excitação do neurônio pós-sináptico e à facilitação da transmissão do sinal nociceptivo para regiões supraespinhais (Basbaum et al., 2009).

Já foi demonstrado que a liberação central de glutamato está relacionada à indução de nocicepção após aplicação de estímulos inflamatórios periféricos. Na primeira fase do teste da formalina, por exemplo, há liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal, levando ao aumento da sensibilidade dos neurônios encontrados neste local (sensibilização central) (Malmberg e Yaksh, 1995; Vidal-Torres et al., 2012). O mesmo é observado com o óleo de mostarda (agente inflamatório irritante que excita fibras de pequeno diâmetro), que quando aplicado na pata de ratos provoca comportamentos nociceptivos que são correspondentes ao aumento de glutamato no fluido cerebroespinhal (Ishikawa et al., 1999). Além disso, quando

administrado na gengiva de ratos, o óleo de mostarda provoca alterações neuroplásticas em neurônios nociceptivos que são atenuadas pelo tratamento i.t. prévio dos animais com o antagonista do receptor NMDA MK-801 (Chiang et al., 1998).

Corroborando o efeito central que a dipirona pode exercer, Neugebauer e colaboradores (1994) utilizaram um modelo de inflamação articular em gatos para demonstrar que a dipirona administrada pela via i.v. na dose de 50 mg/kg (dose esta que foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida por ET-1 nesta dissertação) provoca uma redução da excitação de neurônios espinhais, inclusive quando os registros foram feitos após transecção da medula espinhal (espinhalização) para suprimir as influências inibitórias descendentes. Em contrapartida, a dipirona promoveu pouca redução da atividade de fibras periféricas aferentes do tipo C e Aδ.

Outros peptídeos também são importantes para a transmissão do sinal nociceptivo. A substância P, por exemplo, é vital para este fenômeno, sendo sintetizada por fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro e liberada de suas terminações centrais na medula espinhal em resposta à aplicação de estímulos nocivos (Yaksh et al., 1980; Kuraishi et al., 1989; Dugan et al., 1990). A aplicação de substância P por iontoforese excita de forma seletiva os neurônios nociceptivos localizados no corno dorsal da medula espinhal (de Koninck e Henry, 1991) e a sua administração pela via i.t. em roedores provoca comportamentos indicativos de nocicepção, como o ato de morder a área injetada e arranhar os membros anteriores (Frenk, Bossut e Meyer, 1988), além de reduzir o tempo de latência no teste de *tail-flick* (Cridland e Henry, 1988). Em relação à distribuição de receptores da substância P, estudos imuno-histoquímicos mostram que a sua maior concentração é encontrada na lâmina I do corno espinhal dorsal e que ela aumenta em modelos de dor inflamatória crônica e neuropática em camundongos (Abbadie et al., 1996). A substância P, agindo através desses receptores, gera uma grande resposta pós-sináptica e potencializa a atividade de receptores NMDA, pois leva à sua fosforilação pela PKC, o que modifica a cinética de ligação do  $Mg^{2+}$  e altera a resposta do receptor NMDA a estímulos subsequentes (Thompson, Dray e Urban, 1994; Woolf e Costigan, 1999).

Dessa forma, é possível que a dipirona e seus metabólitos estejam afetando a ação ou a liberação de glutamato na medula após a ativação das fibras C e Aδ pela ET-1, o que interromperia a transmissão do sinal nociceptivo e reduziria, portanto, a intensidade da nocicepção. Não é possível descartar, ainda, que a dipirona, 4-AA e 4-MAA estejam

agindo na liberação de substância P (ou ainda de outros mediadores centrais) para exercer o efeito antinociceptivo aqui observado. Entretanto não há dados diretos que apontem que a dipirona e seus principais metabólitos tenham esta capacidade, enquanto que, como citado anteriormente, já foi demonstrado que a dipirona é capaz de atenuar a nocicepção induzida por glutamato i.t. (Beirith et al., 1998; Siebel, Beirith e Calixto, 2004).

Além de provocar dor aguda, a ET-1 pode também induzir hiperalgesia a diferentes estímulos, como o mecânico (da Cunha et al., 2004; Motta, Calixto e Rae, 2006; Khodorova et al., 2009b) e térmico (Menéndez et al., 2003; Baamonde et al., 2004; Motta et al., 2009). No presente estudo foi avaliada a influência da dipirona e seus metabólitos na hiperalgesia mecânica induzida por injeção s.c. de ET-1 (10 pmol) na pata traseira, sendo que o comportamento foi avaliado por até 5 h após a injeção do peptídeo. O tratamento prévio com dipirona ou 4-MAA foi capaz de atenuar a hiperalgesia entre 2 e 4 h após a administração da ET-1, tanto pela via sistêmica quanto pelas vias local e central. A 4-AA, no entanto, não foi capaz de atenuar a hiperalgesia mecânica, independentemente da via de administração. Esses resultados apontam que os dois metabólitos estudados não agem exatamente da mesma maneira sobre a resposta nociceptiva declarada à ET-1 e sobre a hiperalgesia mecânica e reforçam que os mecanismos envolvidos na gênese de cada efeito da ET-1 são distintos.

Dados anteriores já haviam demonstrado que o pré-tratamento local com dipirona, 4-AA ou 4-MAA atenua a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de PGE<sub>2</sub> na pata de ratos. Contudo, apenas o efeito provocado pela administração de 4-AA foi prejudicado pelo pré-bloqueio de receptores CB1 locais, corroborando, portanto, nossos resultados ao evidenciar que os dois principais metabólitos da dipirona possuem formas de ação distintas (Santos et al., 2013). Além disso, os dados aqui apresentados mostram também que as diferenças na gênese da nocicepção aguda e da hiperalgesia mecânica induzidas por ET-1 são importantes para a ação da dipirona e seus metabólitos.

Existem vários subtipos de neurônios mecanossensíveis que possuem limiares de ativação diferentes, fazendo a transdução de tipos específicos de estímulos mecânicos (desde a propriocepção até estímulos nocivos). Em mamíferos, a aplicação de estímulos mecânicos nocivos na pele leva à ativação de fibras Aδ e C, sendo que ambas são de adaptação lenta e possuem alto limiar de ativação mecânica. Para que ocorra a detecção desses estímulos é necessária a presença de canais mecanotransdutores nos terminais dos neurônios sensoriais. Estes canais

têm como função converter força mecânica (que cause pressão, deformação ou estiramento) em sinais elétricos locais que despolarizem o campo receptivo e gerem potenciais de ação propagados até o SNC (Delmas, Hao e Rodat-Despoix, 2011).

Embora as propriedades desses mecanotransdutores não sejam bem conhecidas nos mamíferos, alguns canais se mostram como candidatos em potencial. Dentre eles estão os canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) e a superfamília dos canais TRP. Nos neurônios sensoriais de mamíferos os canais TRP são mais conhecidos por reconhecerem estímulos térmicos, mas os canais TRPV4 e TRPA1 estão envolvidos na resposta ao toque (Delmas, Hao e Rodat-Despoix, 2011). O TRPV4 se mostrou importante para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de origem inflamatória e afetar a sua expressão em camundongos reduz a sensibilidade à aplicação de estímulos mecânicos nocivos (Suzuki et al., 2003; Alessandri-Haber et al., 2006). O TRPA1, por sua vez, é encontrado em neurônios mecanossensíveis e contribui para a resposta neural dessas células ao toque (Kindt et al., 2007). Camundongos nocaute para este receptor apresentam problemas na detecção de estímulos mecânicos nocivos agudos e no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica induzida por bradicinina (Kwan et al., 2006; Bautista et al., 2006).

A hiperalgesia mecânica pode estar também relacionada com a indução de sensibilização central, fenômeno resultante de alterações nas propriedades dos neurônios no SNC de modo a desajustar a relação entre a sensação nociceptiva e a intensidade ou duração do estímulo nociceptivo periférico. Em geral, ocorrem três alterações principais na medula espinhal: aumento da excitabilidade da membrana, aumento da eficácia sináptica ou redução da inibição. Quando os neurônios espinhais são afetados eles desenvolvem aumento da atividade espontânea, redução do limiar de ativação e aumento dos seus campos receptivos. Alguns neurônios que anteriormente eram dedicados à transmissão de informações nociceptivas passam a agir como neurônios de amplo alcance dinâmico, respondendo tanto a estímulos nocivos quanto inócuos. Além disso, pode ocorrer *wind up* temporal, onde há um aumento progressivo da resposta do neurônio a uma série de estímulos inócuos, e alterações que duram mais do que o fenômeno iniciador do sinal nociceptivo. A indução de sensibilização central requer que o estímulo nocivo aplicado seja de alta intensidade e duradouro, e que ocorra a ativação simultânea de várias fibras por dezenas de segundos (Latremoliere e Woolf, 2009). Embora existam evidências mostrando que o sistema endotelinérgico está envolvido na sensibilização central



em modelos de dor por dano tecidual (Mujenda et al., 2007) e que a administração de ET-1 na pata de camundongos é capaz de ativar neurônios espinhais (Menéndez et al., 2003), ainda não se sabe se a estimulação periférica exercida pela ET-1 é suficientemente intensa a ponto de induzir sensibilização central.

Vários trabalhos apontam mecanismos de ação da dipirona no SNC que poderiam explicar seu efeito antinociceptivo quando administrado pela via i.t.. Um desses mecanismos envolveria o sistema opióide endógeno, o que é evidenciado pela capacidade da dipirona de potencializar a ação de fármacos opióides, já que a administração concomitante de doses sub-efetivas de morfina e dipirona produz efeito analgésico maior do que o induzido isoladamente por cada fármaco em doses efetivas (Aguirre-Bañuelos e Granados-Soto, 1999; López-Muñoz et al., 2008). O mesmo fenômeno é observado quando AINEs são administrados juntamente com opióides (Malmberg et al., 1993; Maves et al., 1994; Souter, Fredman e White, 1994), o que, somado ao fato de que a naloxona (antagonista opióide não seletivo) administrada pela via central é capaz de atenuar a analgesia induzida por AINEs, levou à elaboração de hipóteses sobre a interação do sistema opióide endógeno com a via do ácido araquidônico e das COXs. Sabe-se que a COX-1 e a COX-2 são expressas de maneira constitutiva no SNC (cérebro e medula espinhal). Entretanto, certas manipulações experimentais, inclusive a aplicação de estímulos inflamatórios periféricos (como a administração de CFA ou carragenina, por exemplo) são capazes de elevar a expressão de COX-2 na medula espinhal a níveis acima do basal, o que é não é observado com a COX-1 (Hay e Bellerocche, 1997; Beiche et al., 1998; Vanegas e Shaible, 2001; Fujikawa et al., 2012).

Também é sabido que agonistas  $\mu$ -opióides produzem antinocicepção pela inibição de interneurônios GABAérgicos supraespinhais que freiam a atividade de neurônios do controle nociceptivo descendente (Basbaum e Fields, 1984; Osborne et al., 1996). A ação desses agonistas se daria principalmente pela inibição de correntes de cálcio voltagem-dependentes e pela abertura de canais de potássio retificadores de entrada. Contudo, agentes que comprovadamente modulam essas correntes não foram capazes de alterar a ação de agonistas  $\mu$ -opióides sobre neurônios GABAérgicos. Vários inibidores do metabolismo do ácido araquidônico, entretanto, o foram, incluindo inibidores de PLA<sub>2</sub>, inibidores não seletivos de lipoxigenases (LOX) e inibidores seletivos para 12-LOX (Christie, Vaughan e Ingram, 1999). Já a inibição da atividade das enzimas COX e da 5-LOX não evitaram a ação dos opióides. Frente a esses dados, foi

sugerido que o bloqueio das COX não inibe de forma direta os interneurônios GABAérgicos, mas desvie o metabolismo do ácido araquidônico em direção à via da 12-LOX, que, por sua vez, exerceria este efeito inibitório.

Assim, considerando que a dipirona apresenta uma tendência de inibição preferencial da COX-2 (a isoforma cujo aumento de expressão no SNC está relacionado com inflamação periférica; Ibuki et al., 2003; Seybold, Jia e Abrahams, 2003) em relação a COX-1 (Campos et al., 1999; Pierre et al., 2007), é possível que o efeito antinociceptivo da administração i.t. de dipirona e 4-MAA possa ser atribuído à interação do metabolismo do ácido araquidônico com o sistema opioide. Entretanto, não seria adequado atribuir a este mecanismo todo o efeito anti-hiperalgésico da dipirona e da 4-MAA observa do na hiperalgisia mecânica induzida por ET-1. Primeiro porque embora o 4-MAA seja de 8 a 9 vezes mais potente do que a 4-AA na inibição da atividade das COX (Hinz et al., 2007), a 4-AA é, sim, capaz de inibir a ação das enzimas, o que significa que o pré-tratamento central com essa substância resultaria ao menos na atenuação da hiperalgisia (mesmo que de forma não significativa em termos estatísticos), o que não ocorreu. Segundo, o tratamento local com dipirona ou 4-MAA também promoveu efeito anti-hiperalgésico, o que dificilmente está relacionado com a ação das substâncias na COX-2 encontrada na medula espinhal.

Os dados aqui descritos apontam que, além do componente central, o efeito supressor da dipirona e da 4-MAA na hiperalgisia mecânica induzida por ET-1 apresenta um componente local periférico, o qual não foi observado em relação à inibição do efeito nociceptivo declarado do peptídeo (comparar Figuras 13 e 7). Com o intuito de esclarecer este mecanismo subjacente ao efeito anti-hiperalgésico mecânico da aplicação local de dipirona e 4-MAA, investigou-se a migração de células inflamatórias e a expressão de citocinas em amostras da pele da pata dos camundongos. Em um cenário inflamatório ocorre a liberação de muitos mediadores químicos no sítio da lesão que desempenham funções pró-inflamatórias, como quimiotaxia e ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, degranulação de mastócitos e sinalização para células vasculares, com o intuito de aumentar o fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, facilitando o recrutamento de leucócitos inflamatórios e causando edema (Chiu, Von Hehn e Woolf, 2012). Dentre os mediadores liberados nesse processo estão as citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para o recrutamento e ativação de células imunes, auxiliando, assim, na gênese do processo inflamatório (Verri et al., 2006).

Citocinas são polipeptídeos produzidos e liberados por células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios (como vírus, parasitas e bactérias e seus produtos) ou em resposta a outras citocinas. Em geral, são liberadas por vários tipos celulares de forma sequencial e controlada e são responsáveis pela produção de mediadores finais envolvidos na indução de sinais e sintomas inflamatórios (Verri et al., 2006). As principais evidências da participação de citocinas pró-inflamatórias na indução e manutenção da dor provém de experimentos demonstrando que lesões em tecido nervoso periférico acarretam aumento rápido e sustentado da expressão de citocinas (Taskinen et al., 2000; Üçeyler et al., 2007), que a administração de citocinas exógenas provoca comportamentos nociceptivos em animais (Junger e Sorkin, 2000; Zelenka, Schäfers e Sommer, 2005) e que o tratamento com citocinas anti-inflamatórias ou com inibidores de citocinas pró-inflamatórias provoca antinocicepção (Cunha et al., 1999; Milligan et al., 2005).

Muitos estudos demonstram que a administração de citocinas exógenas é capaz de provocar hiperalgesia mecânica em roedores, processo que, inclusive, pode envolver o sistema endotelinérgico. Quando injetada na pata de ratos, a IL-12 induz hiperalgesia mecânica dose-dependente que é mediada por receptores  $ET_B$  (mas não  $ET_A$ ), não sendo, entretanto, susceptível a bloqueio pelo tratamento com indometacina (Verri et al., 2005). A administração de IL-18 pela via s.c. na pata de ratos também promove hiperalgesia mecânica dose-dependente insensível à indometacina, mas neste caso a mesma é atenuada por antagonistas do receptor  $ET_A$ , mas não do  $ET_B$  (Verri et al., 2004; Verri et al., 2007). A IL-15, por sua vez, também induz hiperalgesia mecânica em camundongos, mas o fenômeno é sensível à indometacina e envolve a liberação sequencial de IFN- $\gamma$  (interferon-  $\gamma$ ), ET-1 e PGE<sub>2</sub> (Verri et al., 2006).

Contudo, um dos primeiros estudos que demonstrou a capacidade de citocinas de mediar a nocicepção inflamatória foi realizado com IL-1 $\beta$ , no qual a administração intraplantar dessa citocina causou hiperalgesia mecânica mediada pela liberação de prostanoídes (Ferreira et al., 1988). A IL-1 $\beta$  também participa na indução de hiperalgesia inflamatória causada por administração de carragenina, LPS ou CFA na pata de roedores (Cunha et al., 1992; Woolf et al., 1997; Cunha et al., 2005). No modelo de nocicepção induzida por CFA, em especial, a IL-1 $\beta$  provoca a liberação de NGF, que parece ser essencial para a hiperalgesia induzida pelo adjuvante (Safieh-Garabedian et al., 1995).

De forma geral, considera-se que as citocinas podem induzir nocicepção de duas maneiras: sensibilizando os neurônios sensoriais periféricos e reduzindo o seu limiar de ativação (sem, no entanto, gerar um potencial de ação *per se*), ou ativando-os diretamente ao agir em seus receptores específicos encontrados nessas fibras aferentes. A ação direta de IL-1 $\beta$  em nociceptores foi demonstrada em experimentos onde a sua administração em patas de roedores foi capaz de gerar disparos espontâneos e temporários detectáveis em corpos de neurônios presentes em DRGs (Fukuoka et al., 1994). Além disso, em cultura primária de neurônios de DRG, a inoculação de IL-1 $\beta$  aumenta a excitabilidade dos nociceptores ao agir em canais de sódio, intensificando correntes TTXr persistentes de baixo limiar e lentas de alto limiar, de forma dependente de sinalização intracelular envolvendo a p38 MAPK (Binshtok et al., 2008). Já a sua capacidade de sensibilizar fibras nociceptivas periféricas envolve a indução de NGF e produção de PGE<sub>2</sub>, secundária à indução de COX-2 em células imunes e outras células não-neuronais (Safieh-Garabedian et al., 1995).

As consequências deletérias da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias podem ser limitadas pela produção e liberação sequencial de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13. Em humanos, o desequilíbrio entre estas duas classes é considerado um fator relevante na indução e manutenção da dor, pois em pacientes que apresentam quadros de dor crônica estes perfis de expressão estão alterados (Üçeyler et al., 2006; Üçeyler et al., 2007). A IL-10 é considerada uma das citocinas anti-inflamatórias mais importantes em humanos. Ela é secretada por uma variedade de células (monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, granulócitos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos) e age limitando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ), desativando macrófagos e controlando a diferenciação e proliferação de macrófagos e linfócitos T e B (Glocker et al., 2011). A IL-10 consegue, ainda, aumentar a expressão de outras citocinas anti-inflamatórias endógenas e reduzir a expressão de receptores para citocinas pró-inflamatórias (Zhang e An, 2007). Dessa forma, a IL-10 ajuda na proteção contra respostas imunes e danos teciduais excessivos, ao manter sob controle eventos pró-inflamatórios.

Em diferentes modelos e testes de dor a administração de IL-10 exógena apresenta propriedades antinociceptivas (Milligan et al., 2005; Zhang e An, 2007) e anti-hiperalgésicas (Poole et al., 1995; Kanaan et al., 1998; Chacur et al., 2004). Além disso, agentes anti-inflamatórios e analgésicos são capazes de aumentar seus níveis (Chen et al., 2010;

Leger et al., 2011; Ferreira et al., 2013) e a expressão anatômica de sua proteína e RNAm se sobrepõe com regiões relevantes para a sinalização nociceptiva, sugerindo que uma ação biológica adicional de IL-10 pode ser controlar ações patológicas mediadas pela glia e células imunes em neurônios (Milligan et al., 2012). Shen, Jia e Abrahams (2013) demonstraram que fibras A e C expressam receptores para a IL-10 e que essa citocina reduz a expressão dos canais Nav1.6 e Nav 1.8 (e dos seus RNAm) em neurônios do DRG.

Considerando esses aspectos, bem como os relatos de que a ET-1 aumenta a produção de IL-1 $\beta$  em cultura de monócitos humanos (Cunningham et al., 1997) e na região pré-óptica de ratos após administração i.c.v. (Fabricio et al., 2006), decidimos avaliar se a nocicepção declarada e a hiperalgesia mecânica induzidas pela ET-1 estariam associadas ao aumento da liberação dessa citocina, bem como a susceptibilidade da produção da mesma à inibição pela dipirona e seus metabólitos. Como as ações da IL-1 $\beta$  parecem ser moduladas pela IL-10, decidimos ainda verificar se a expressão desta citocina anti-inflamatória também estaria implicada nos efeitos antinociceptivos e anti-hiperalgésicos da dipirona e seus metabólitos.

De fato, a dosagem dos níveis de IL-1 $\beta$  na pele da pata traseira revelou que a injeção s.c. intraplantar de ET-1 promoveu um aumento tardio significativo da produção e liberação desta citocina 4 horas após a administração do peptídeo. Como os níveis de IL-1 $\beta$  ao final dos primeiros 15 minutos da injeção de ET-1 não foram diferentes dos do grupo controle tratado com veículo, o aumento de IL-1 $\beta$  parece coincidir apenas com o período no qual o peptídeo causa hiperalgesia mecânica. Adicionalmente, amostras da pele da pata dos animais tratados com dipirona ou 4-MAA i.p. antes da injeção intraplantar de ET-1 mostraram quantidades reduzidas de IL-1 $\beta$  quando comparados com o grupo controle tratado com salina. Em contraposição, a 4-AA, que não mostrou efeito anti-hiperalgésico, não foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 $\beta$  a um patamar significativo. Entretanto, nenhum dos tratamentos aumentou a expressão de IL-10 nas mesmas amostras de pele da pata dos animais em nenhum dos grupos analisados, o que parece refutar a hipótese de que esta citocina estaria envolvida nos efeitos antinociceptivos e/ou anti-hiperalgésicos da dipirona, 4-AA ou 4-MAA.

Os resultados sugerem, portanto, que a IL-1 $\beta$  possa ser importante para a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 e também para o efeito anti-hiperalgésico da dipirona e da 4-MAA. Após esta constatação, foram realizados alguns experimentos para investigar a possível fonte de liberação de IL-1 $\beta$ .

As citocinas são produzidas por uma vasta gama de células, mas as fontes principais são os linfócitos T *helper* (Th) e os macrófagos. Podem, ainda, ser produzidas no tecido nervoso periférico durante processos fisiológicos e patológicos por macrófagos residentes ou recrutados, mastócitos, células endoteliais e células de Schwann. A IL-1 $\beta$ , em especial, é liberada principalmente por monócitos, macrófagos e células não-imunes, como fibroblastos e células endoteliais após lesão celular, infecção e inflamação (Zhang e An, 2007). Entretanto, considera-se que os macrófagos e as células gliais são os principais liberadores dessa citocina que estão relacionados com a nocicepção (Kress, 2010). É interessante ressaltar que a ET-1 é capaz de induzir monócitos a liberarem IL-1 $\beta$  (Cunningham et al., 1997) e de promover a secreção de quimiocinas a partir de macrófagos humanos (Gonsalves e Kalra, 2010). Como macrófagos e monócitos são células amplamente envolvidas no desenvolvimento de inflamação, seria possível que o processo inflamatório local induzido pela administração de ET-1 exógena na pata de camundongos promovesse a migração e ativação dessas células, o que levaria à liberação de IL-1 $\beta$ . Uma vez produzida, a IL-1 $\beta$  poderia estimular seus receptores específicos nas fibras sensoriais periféricas, gerando potenciais de ação e sinalização nociceptiva, ou agir de forma parácrina em outras células imunes, provocando a secreção de outros mediadores inflamatórios (como a PGE<sub>2</sub>) que sensibilizariam ou ativariam o nociceptor.

Contudo, conforme demonstrado no presente trabalho (Figuras 16 e 17), não foram observadas alterações relevantes na atividade da MPO ou na migração de células inflamatórias após a administração s.c. intraplantar de ET-1 na pata de camundongos, quando foram comparadas amostras de pele coletadas 15 min ou 4 horas após a administração de ET-1 com aquelas do grupo controle correspondente tratado com PBS. Cumpre destacar, entretanto, que foram detectados níveis de ativação de MPO mais elevados em amostras coletadas 4 h após a injeção de ET-1 ou PBS na pata, quando comparados aos valores daquelas obtidas dos grupos correspondentes aos 15 min após a injeção. Portanto, esse aumento da atividade da MPO é uma resposta à lesão provocada pela inserção da agulha utilizada para o tratamento, e não pelas substâncias administradas. Por sua vez, a análise estatística das contagens de células inflamatórias na pele da pata dos camundongos, realizadas em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina também não evidenciou diferenças entre nenhum dos grupos. Não houve, portanto, migração dessas células para o sítio da administração de ET-1.

Este último conjunto de resultados não se alinha a relatos que apontam a participação dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no recrutamento de neutrófilos em modelos de inflamação inata. Especificamente, antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> inibem a migração de neutrófilos induzida por LPS *in vivo* em um modelo de pleurisia em camundongos (Sampaio, Rae e Henriques, 2000), e o bloqueio de ambos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> inibe a migração de neutrófilos para a articulação induzida por zimosan em ratos (Conte et al., 2008), sendo que nos dois estudos a determinação de migração celular foi realizada por contagem em lavado pleural ou sinovial, respectivamente. Entretanto, outro grupo demonstrou que a administração intraplantar de ET-1 (30 ou 100 pmol/sítio) não foi capaz de alterar os níveis de atividade da MPO (Verri et al., 2009), corroborando, dessa forma, os nossos resultados.

Assim, a partir dos dados obtidos através desses dois métodos experimentais, não é possível afirmar que a inflamação, a nocicepção ou que a hiperalgisia mecânica induzidas por ET-1 estejam relacionadas com a migração de células inflamatórias. Portanto, é provável que a resposta inflamatória e o consequente edema e nocicepção observados após a administração de ET-1 sejam resultantes principalmente da inflamação neurogênica induzida pelo peptídeo. Dessa forma, a administração de ET-1 exógena ativaria de forma direta os terminais periféricos dos neurônios nociceptivos (como já foi demonstrado por Gokin et al., 2001), levando à liberação de mediadores químicos que agiriam em células residentes não-neuronais e/ou vasculares, o que facilitaria a produção de componentes da sopa inflamatória (incluindo a liberação de IL-1 $\beta$ ) e propagaria o processo inflamatório em si, causando extravasamento de fluido para o espaço intersticial e provocando o edema.

Já foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  é liberada por células não relacionadas de forma direta com o sistema imunológico. Em 2001, Copray e colaboradores encontraram IL-1 $\beta$  (tanto o RNAm quanto a proteína em si) expressa em neurônios aferentes sensoriais do DRG de ratos, principalmente aqueles com médio e grande diâmetro. O mesmo dado foi observado em neurônios simpáticos em cultura, sendo que estes neurônios autonômicos podem auxiliar na regulação de respostas imunológicas (Freidin, Bennett e Kessler, 1992). Além disso, células de Schwann em cultura, após estimulação com diversos agentes, também são capazes de secretar IL-1 $\beta$  (Bergsteinsdottir et al., 1991).

Corroborando nossa hipótese, múltiplos trabalhos apontam a expressão de componentes do sistema endotelinérgico em células de Schwann de várias espécies. Em capivaras, a ET-1 se liga em receptores

ET<sub>A</sub> presentes em células de Schwann que envolvem neurônios perivasculares (Loesch, Dashwood e Coppi, 2013) e em roedores receptores ET<sub>B</sub> são encontrados em células de Schwann no DRG (Pomonis et al., 2001; Peters et al., 2004). Assim, é possível que a ET-1 administrada na pata de camundongos provoque a liberação de IL-1 $\beta$  a partir de células de Schwann através da ativação de receptores ET<sub>B</sub>, provocando, dessa forma, a hiperalgesia mecânica observada nos resultados mostrados neste trabalho.

Essa possibilidade vai de encontro a dados da literatura que apontam que a ativação de receptores ET<sub>B</sub> é importante para a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1. Em camundongos, o pré-tratamento com BQ-788 (antagonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub>) bloqueia totalmente a hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 (Baamonde et al., 2004). Em ratos, no entanto, o antagonista provoca apenas redução parcial e o mesmo efeito é obtido após o tratamento com o BQ-123 (antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub>), sugerindo uma co-participação dos dois subtipos de receptores (Balonov, Khodorova e Strichartz, 2006; Motta et al., 2009). Outros dados apontam, entretanto, que a hipernocicepção causada por ET-1 na pata de ratos é mediada exclusivamente pelo receptor ET<sub>B</sub> (da Cunha et al., 2004).

Além disso, a participação dos dois subtipos de receptores no desenvolvimento da nocicepção declarada induzida por ET-1 também não está bem elucidada. Embora existam resultados que apontem que o bloqueio do receptor ET<sub>B</sub> é capaz de atenuar esta condição nociceptiva (Motta et al., 2009), outros dados sugerem que este receptor apresenta pouca participação na nocicepção declarada induzida por ET-1 (Millecamps et al., 2010; Piovezan et al., 2000; De-Melo et al., 1998; Menéndez et al., 2003), ou em modelos de dor inflamatória aguda mediados ou potencializados por este peptídeo.

O pré-tratamento com ET-1 é capaz de potencializar a nocicepção provocada pela administração intraplantar de capsaicina através da ativação de receptores ET<sub>A</sub>, sendo que doses mais elevadas do peptídeo perdem essa habilidade de potencialização. Esta perda foi atribuída à ativação de receptores ET<sub>B</sub> anti-nociceptivos, pois o seu bloqueio é capaz de revelar de forma dose-dependente a habilidade nociceptiva de concentrações de ET-1 que, sozinhas, não potencializam a ação da capsaicina (Piovezan et al., 2000). Outro trabalho, também, indica que a potencialização de correntes induzidas por capsaicina em neurônios do DRG pela inoculação de ET-1 é mediada pela ativação de receptores ET<sub>A</sub>, mas não ET<sub>B</sub> (Plant et al., 2007). Já em um modelo de dor pós-isquêmica, a administração de ET-1 na pata de camundongos leva ao



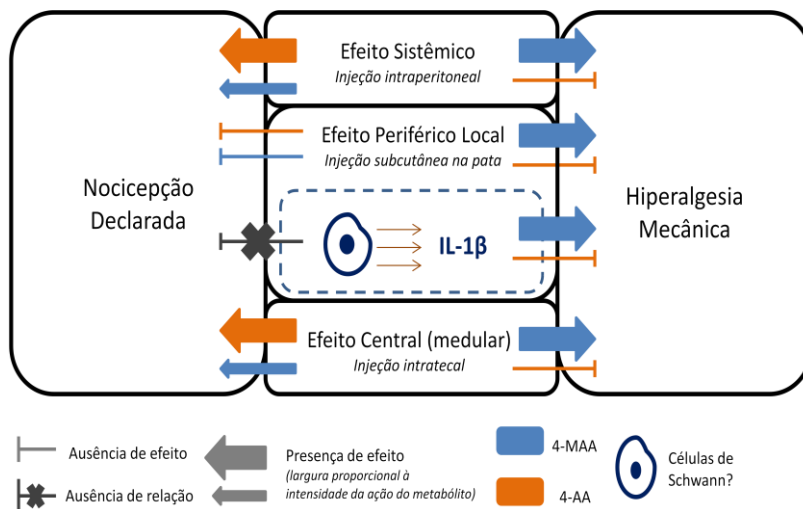
surgimento de comportamentos nociceptivos mediados pela ativação de ET<sub>A</sub>. Nestes experimentos, o pré-tratamento com BQ-788 em doses medianas não atenuou a nocicepção, mas doses a partir de 60 pmol/pata aumentaram o número de comportamentos nociceptivos provocados por ET-1 (Millecamps et al., 2010).

Dessa forma, dados publicados ao longo dos anos reforçam o papel nociceptivo do receptor ET<sub>B</sub> na hiperalgesia mecânica induzida por ET-1, enquanto que na nocicepção declarada provocada pelo peptídeo ou no efeito potencializador que ele exerce em outros modelos de dor inflamatória este receptor não aparece como um mediador importante, apresentando, ainda, possível efeito antinociceptivo.

Portanto, somando dados encontrados na literatura com os resultados apresentados neste trabalho parece adequado afirmar que o efeito antinociceptivo da dipirona e de seus principais metabólitos na nocicepção declarada induzida por ET-1 é mediado, principalmente, por componentes centrais (possivelmente pela inibição da liberação de neurotransmissores como o glutamato e a substância P no corno da raiz dorsal da medula espinhal), enquanto que o efeito anti-hiperalgésico é resultante de uma combinação de fatores centrais (talvez devido à inibição da enzima COX-2 medular, o que potencializaria o efeito antinociceptivo dos prostanóides produzidos pela via da 12-LOX) e locais. As ações locais hiperalgésicas da ET-1 poderiam envolver a ação de IL-1 $\beta$ , ainda que não tenha sido demonstrado que a hiperalgesia mecânica promovida pelo peptídeo seja sensível ao tratamento com antagonistas da IL-1 $\beta$ . Caso esta hipótese seja confirmada, é bastante provável que esta citocina seja liberada por células locais residentes, como as células de Schwann, uma vez que a ET-1 não induziu a migração de células inflamatórias para o sítio da injeção. Considerando que o principal receptor endotelinérgico encontrado nesse tipo celular é o ET<sub>B</sub> (que, por sua vez, parece ser mais importante para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica do que para a nocicepção aguda), é possível que a liberação de citocinas seja iniciada pela ativação desses receptores. Essa interação da dipirona e da 4-MAA (a 4-AA não mostrou efeito anti-hiperalgésico) com um mecanismo induzido pela ativação de ET<sub>B</sub> poderia explicar, também, porque os tratamentos não foram eficazes após a administração local nos experimentos referentes à nocicepção declarada, já que (como discutido anteriormente), o receptor ET<sub>B</sub> pode não ter tanta importância para este fenômeno nociceptivo.

Assim, demonstramos neste trabalho que a dipirona e seus principais metabólitos são capazes de atenuar a nocicepção declarada e a

hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1 (conforme esquematizado na Figura 18), o que evidencia mais um mecanismo pelo qual a dipirona pode atuar para exercer seu efeito analgésico.



**Figura 18. Participação da 4-AA e 4-MAA nos efeitos antinociceptivo e anti-hiperalgésico da dipirona na nocicepção declarada e hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos.** A dipirona, 4-AA e 4-MAA só são capazes de atenuar a **nocicepção declarada** induzida por ET-1 quando administradas pelas vias sistêmica (i.p.) ou central (i.t.), não apresentando efeito local. A 4-AA parece ser mais importante do que a 4-MAA neste efeito antinociceptivo da dipirona, pois a sua dose mínima eficaz é significativamente menor do que a da 4-MAA. Já a **hiperalgesia mecânica** induzida por ET-1 é atenuada apenas pela dipirona e 4-MAA, (sem ser afetada pela 4-AA) agindo tanto central quanto localmente. A liberação de IL-1β a partir de células não imunes e residentes (possivelmente células de Schwann) está envolvida na hiperalgesia mecânica, mas não na nocicepção aguda observadas após a administração de ET-1, e é atenuada pelo pré-tratamento sistêmico com dipirona ou 4-MAA.

## 7. CONCLUSÕES

- A dipirona, a 4-AA e a 4-MAA conseguem atenuar o comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina na pata de camundongos, tanto na primeira fase quanto na segunda;
- A dipirona, a 4-AA e a 4-MAA são capazes de atenuar a nocicepção aguda e a hiperalgesia mecânica induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos, mas não modificam o edema causado pelo peptídeo;
- O efeito na nocicepção aguda é mediado por componentes centrais, mas não periféricos locais;
- A 4-AA parece ser o metabólito mais eficiente na atenuação do efeito nociceptivo declarado da ET-1;
- A dipirona e a 4-MAA (mas não a 4-AA) atenuam a hiperalgesia mecânica, o que é mediado tanto central quanto localmente;
- O efeito anti-hiperalgésico da dipirona e da 4-MAA não parece depender da migração de células inflamatórias para o sítio da lesão e nem da liberação de IL-10;
- A hiperalgesia mecânica induzida por ET-1 é acompanhada de um aumento dos níveis locais de IL-1 $\beta$ ;
- Os níveis locais de IL-1 $\beta$  foram atenuados pela dipirona e 4-MAA no tempo de coleta relativo à hiperalgesia mecânica, enquanto que a 4-AA (que não apresentou ação anti-hiperalgésica) não afetou os níveis locais desta citocina.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadie, C.; Brown, J.L.; Mantyh, P.W. Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. **Neuroscience**, 70:201-9, 1996.

Abbate, R.; Pinto, S.; Gori, A.M.; Paniccia, R.; Coppo, M.; Neri Serneri, G.G. Activity of dipyrone on intraplatelet arachdonic acid metabolism an in vitro study. **Pharmacol Res**, 21:43-50, 1989.

Abbott, F.V.; Hellemans, K.G.C.; Phenacetin, acetaminophen and dipyrone: analgesic and rewarding effects. **Behav Brain Res**, 112Ç177-86, 2000.

Aguiar, F.A.; Malvar, D.C.; Vaz, A.L.L.; Calixto, L.A.; Clososki, G.C.; Gaitani, C.M.; Souza, G.E.P.; Jabor, V.A.P. Simultaneous determination of dipyrone metabolites in rat hypothalamus, cerebrospinal fluid and plasma samples by LC-MS/MS. **Bioanalysis**, 5:2631-45, 2013.

Aguirre-Bañuelos, P.; Granados-Soto, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 42:79-85, 1999.

Akada, Y.; Ogawa, S.; Amano, K.; Fukudome, Y.; Yamasaki, F.; Itoh, M.; Yamamoto, I. Potent analgesic effects of a putative sodium channel blocker M58373 on formalin-induced and neuropathic pain in rats. **Eur J Pharmacol**, 536:248-55, 2006.

Alessandri-Haber, N.; Dina, O.A.; Joseph, E.K.; Reichling, D.; Levine, J.D. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. **J Neurosci**, 26:3864–74, 2006.

Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, 1000:40-56, 2004.

Alvez, D.P.; Duarte, I.D.G. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur J Pharmacol**, 444:47-52, 2002.

Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348:730-2, 1990.

Baamonde, A.; Lastra, A.; Villazón, M.; Bordallo, J.; Hidalgo, A.; Menéndez, L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 369:245-51, 2004.

Bai, Z-T.; Liu, T.; Pang, X-Y.; Chai, Z-F.; Ji, Y-H. Suppression by intrathecal BmK IT2 on rat spontaneous pain behaviors and spinal c-Fos expression induced by formalin. **Brain Res Bulletin**, 73:248-53, 2007.

Balonov, K.; Khodorova, A.; Strichartz, G.R. Tactile allodynia initiated by local subcutaneous endothelin-1 is prolonged by activation of TRPV-1 receptors. **Exp Biol Med (Maywood)**, 231:1165-70, 2006.

Barr, T.P.; Kam, S.; Khodorova, A.; Montmayeur, J.P.; Strichartz, G.R. New perspectives on the endothelin axis in pain. **Pharmacol Res**, 63:532-40, 2011.

Basbaum, A.I.; Fields, H.L. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, 7:309–38, 1984.

Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 139:267-84, 2009.

Bautista, D.M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**. 124:1269–82, 2006.

Beiche, F.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Goppelt-Struebe, M. Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. **Inflamm Res**, 47:482-7, 1998.

Beirith, A., Santos, A. R. S., Rodrigues, A. L. S., Creczynski-Pasa, T. B., Calixto, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, 345:233-245, 1998.

Balonov, K.; Khodorova, A.; Strichartz, G.R. Tactile allodynia initiated by local subcutaneous endothelin-1 is prolonged by activation of TRPV-1 receptors. **Exp Biol Med (Maywood)**, 231:1165-70, 2006.

Benseñor, I.M. Dipyron and blood dyscrasia revisited: “non-evidence based medicine”. **Sao Paulo Med J**, 123: 99-100, 2005.

Bergsteinsdottir, K.; Kingston, A.; Mirsky, R.; Jessen, K.R. Rat Schwann cells produce interleukin-1. **J Neuroimmunol**, 34:15-23, 1991.

Berti-Mattera, L.N.; Gariépy, C.E.; Burke, R.M.; Hall, A.K. Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. **Exp Neurol**, 201:399-406, 2006.

Binshok, A.M.; Wang, H.; Zimmermann, K.; Amaya, F.; Vardeh, D.; Shi, L.; Brenner, G.J.; Ji, R.-R.; Bean, B.P.; Woolf, C.J.; Samad, T.A. Nociceptors are interleukin-1 $\beta$  sensors. **J Neurosci**, 28:14062-73, 2008.

Blackburn-Munro, G.; Ibsen, N.; Erichsen, H.K. A comparison of the anti-nociceptive effects of voltage-activated Na<sup>+</sup> channel blockers in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, 445:231-8, 2002.

Bocca, C.C.; Basso, E.A.; Mosquetta, R. Conformational study of the four main dipyron metabolites through theoretical methods: electrostatic potential maps and NBO calculations. **J Mol Struct**, 815: 75-81, 2007.

Camu, F.; Vanlersberghe, C. Pharmacology of systemic analgesic. **Best Practice and Res Clin Anaesth**, 16:475-88, 2002.

Campos, C.; de Gregorio, R.; García-Nieto, R.; Gago, F.; Ortiz, P.; Alemany, S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **Eur J Pharmacol**, 378:339-47, 1999.

Chacur, M.; Milligan, E.D.; Sloan, E.M.; Wieseler-Frank, J.; Barrientos, R.M.; Martin, D.; Poole, S.; Lamonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Maier, S.F.; Cury, Y.; Watkins, L.R. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, 108:180-91, 2004.

Chen, Y.; Boettger, M.K.; Reif, A.; Schmitt, A.; Üçeyler, N.; Sommer, C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Mol Pain**, 6:13, 2010.

Chiang, C.Y.; Park, S.J.; Kwan, C.L.; Hu, J.W.; Sessle, B.J. NMDA receptor mechanisms contribute to neuroplasticity induced in caudalis nociceptive neurons by tooth pulp stimulation. **J Neurophysiol**, 80:2621-31, 1998.

Chichorro, J.G.; Zampronio, A.R.; Souza, G.E.P.; Rae, G.A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, 123:64-74, 2006.

Chiu, I.M.; von Hehn, C.A.; Woolf, C.J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nat Neurosci**, 15:1063-7, 2012.

Christie, M.J.; Vaughan, C.W.; Ingram, S.L. Opioids, NSAIDs and 5-lipoxygenase inhibitors act synergistically in brain via arachidonic acid metabolism. **Inflamm Res**, 48:1-4, 1999.

Clark, P.; Rowland, S.E.; Denis, D.; Mathieu, M.; Stocco, R.; Poirier, H.; Burch, J.; Han, Y.; Audoly, L.; Therien, A.G.; Xu, D. MF498 [N-{[4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H—pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-methylbenzyl]sulfonyl}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a selective E prostanoicd receptor antagonist, relieves joint inflammation and pain in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. **J Pharmacol Exp Ther**, 325:425-34, 2008.

Cridland, R.A.; Henry, J.L. Intrathecal administration of substance P in the rat: spinal transaction or morphine blocks the behavioural responses but not the facilitation of the tail flick reflex. **Neurosci Lett**, 84:203-8, 1988.

Coderre, T.J.; Melzack, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**, 12:3671-5, 1992.

Conte, F.P.; Barja-Fidalgo, C.; Verri, W.A.; Cunha, F.Q.; Rae, G.A.; Penido, C.; Henriques, M.G.M.O. Endothelins modulate inflammatory



reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$ -, and CXCL-1. **J Leukoc Biol**, 84:652-60, 2008.

Copray, J.C.V.M; Mantingh, I.; Brouwer, N., Biber, K.; Küst, B.M.; Liem, R.S.B.; Huitinga, I.; Tilders, F.J.H.; Van Dam, A-M.; Boddeke, H.W.G.M. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **J Neuroimmunol**, 118:203–11, 2001.

Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J-C.; Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72:359-71, 2005.

Cunha, F.Q.; Poole, S.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, 107:660–4, 1992.

Cunha, F.Q.; Poole, S.; Lorenzetti, B.B.; Veiga, F.H.; Ferreira, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br J Pharmacol**, 126:45–50, 1999.

Cunha, T.M.; Verri, W.A. Jr.; Silva, J.S.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102:1755-60, 2005.

da Cunha, J.M.; Rae, G.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Endothelins induce ET<sub>B</sub> receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **Eur J Pharmacol**, 501:87-94, 2004.

Cunningham, M.; Huribal, M.; Bala, R.J.; McMillen, M. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. **Crit Care Med**, 25:958-64, 1997. (abstract)

Davar, G.; Hans, G.; Fareed, M.U.; Sinnott, C.; Strichartz, G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **Neuroreport**, 9:2279-83, 1998.

Delmas, P.; Hao, J.; Rodat-Despoix, L. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. **Nat Rev Neurosci**, 12:139-53, 2011.

De-Melo, J.D.; Tonussi, C.R.; D'Orléans-Juste, P.; Rae, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naïve and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptors antagonists. **Pain**, 77:261-9, 1998.

Duarte, I.D.G.; Santos, I.R.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, 217:225-7, 1992.

Dubuisson, D.; Dennis, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, misperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4:161-74, 1977

Ergün, H.; Frattarelli, D.A.C.; Aranda, J.V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dypirone. **J Biomed Pharmaceut Sci**, 35:479-87, 2005.

Erol, K.; Simagul, B.; Kilic, F.S.; Yigitaslan, S.; Dogan, A.E.; The role of inflammation and COX-derived prostanoids in the effects of bradykinin in isolated rat aorta and urinary bladder. **Inflammation**, 35:420-8, 2012.

Escobar, W.; Ramirez, K.; Avila, C.; Limongi, R.; Vanegas, H.; Vazquez, E. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. **Eur J Pain**, 16:676-89, 2012.

Fabricio, A.S.; Silva, C.A.; Rae, G.A.; D'Orléans-Juste, P.; Souza, G.E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. **Br J Pharmacol**, 125:542-548, 1998.

Fabricio, A.S.; Rae, G.A.; D'Orléans-Juste, P.; Souza, G.E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Res**, 1066:92-100, 2005.

Fabricio, A.S.C.; Tringali, G.; Pozzoli, G.; Melo, M.C.; Vercesi, J.A.; Souza, G.E.P.; Navarra, P. Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and prostaglandin production in the peroptic area of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 290:R1515-23, 2006.

Feldmann, D.F.; Zuehlke, S.; Heberer, T. Occurrence, fate, and assessment of polar metamizole (dipyrone) residues in hospital and municipal wastewater. **Chemosphere**, 71:1754-64, 2008.

Ferreira, S.H.; Lorenzetti, B.B.; Bristow, A.F.; Poole, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, 334:698-700, 1988.

Ferreira, S.H.; Romitelli, M.; De Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol**, 13 (suppl.5):S220-2, 1989. (abstract)

Ferreira, L.C.; Grabe-Guimarães, A.; Paula, C.A.; Michel, M.C.P.; Guimarães, R.G.; Rezende, S.A.; Souza Filho, J.D.; Sáude-Guimarães, D.A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Camponesia adamantium*. **J Ethnopharmacol**, 145:100-8, 2013.

Freidin, M.; Bennett, M.V.L.; Kessler, J.A. Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 $\beta$ . **Proc Natl Acad Sci USA**, 89:10440:3, 1992.

Frenk, H.; Bossut, D.; Mayer, D.J. Is substance P a primary afferent neurotransmitter for nociceptive input? **Brain Res**, 455:240-6, 1988.

Fujikawa, M.; Ibuki, T.; Matsumura, K.; Sawa, T. Inflammatory hyperalgesia: the role of the prostaglandin system in the spinal cord. **Advances in Neurimmun Biol**, 3:197-207, 2012.

Fukuoka, H.; Kawatani, M.; Hisamitsu, T.; Takeshige, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. **Brain Res**, 657:133-140, 1994.

Genç, E.; Avunduk, M.C.; Genç, B.O.; Sahin, A.S.; Oz, M. The effect of chronic administration of sumatriptan and dipyrone on serotonergic system in the rat brain: an immunohistochemical study. **Acta Neurol Scand**, 120:264-9, 2009.

Gewehr, C.; Oliveira, S.M.; Rossato, M.F.; Trevisan, G.; Dalmolin, G.J.; Rigo, F.K.; Castro Júnior, C.J.; Cordeiro, M.N.; Ferreira, J.; Gomez, M.V. Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. **PLoS Negl Trop Dis**, 7:e2198, 2013.

Glocker, E.-O.; Kotlarz, D.; Klein, C.; Shah, N.; Grimbacher, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Ann NY Acad Sci**, 1246:102-7, 2011.

Godoy, M.C.M.; Figuera, M.R.; Souza, F.R.; Flores, A.E.; Rubin, M.A.; Oliveira, M.R.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P.; Bonacorso, H.G.; Mello, C.F.  $\alpha_2$ -adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not for dipyrone. **Eur J Pharmacol**, 496:93-7, 2004.

Gokin, A.P.; Fareed, M.U.; Pan, H.L.; Strichartz, G.R.; Davar, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behaviour and excitation of nociceptors in rats. **J Neurosci**, 21:5358-66, 2001.

Gold, M.S.; Gebhart, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Focus in pain. **Nat Med**, 16:1248-57, 2010.

Gonsalves, C.; Kalra, V.K. Endothelin-1-induced macrophage inflammatory protein-1  $\beta$  expression in monocytic cells involves hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and AP-1 and is negatively regulated by microRNA-195. **J Immunol**, 185:6253-64, 2010.

Hay, C.; de Belleruche, J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. **NeuroReport**, 8:1249– 51, 1997.

Hinz, B.; Cheremina, O.; Bachmakov, J.; Renner, B.; Zolk, O.; Fromm, M.F.; Brune, K. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **FASEB J**, 21:2343-51, 2007.

Hucho, T.; Levine, J.D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, 55:365-76, 2007.

Hunskar, S.; Berge, O.-G.; Hole, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, 25:125-32, 1986.

Hylden, J.L.K.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, 67:313-6, 1980.

Ibuki, T.; Matsumura, K.; Yamazaki, Y.; Nozaki, T.; Tanaka, Y.; Kobayashi, S. Cyclooxygenase-2 is induced in the endothelial cells throughout the central nervous system during carrageenan-induced hind paw inflammation its possible role in hyperalgesia. **J Neurochem**, 86(2):318-28, 2003.

Ivey, G.L.; Williams, F.M.; Collins, P.D.; Jose, P.J.; Williams, T.J. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. **J Clin Invest**, 95(6):2720-8, 1995.

Jang, J.H.; Clark, J.D.; Xiangpi, L.; Yorek, M.S.; Usachev, Y.M.; Brennan, T.J. Nociceptive sensitization by complement C5a and C3a in mouse. **Pain**, 148:343-52, 2010.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413:203-10, 2001.

Jones, S.L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **Eur J Pharmacol**, 318:37-40, 1996.

Jornal Brasileiro de Medicina (Brasil). **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**, 41. ed. Rio de Janeiro: Public Cientifica, 2012/2013.

Junger, H.; Sorkin, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF- $\alpha$ . **Pain**, 85:145–151, 2000.

Kanaan, S.A.; Poole, S.; Saadé, N.E.; Jabbur, S.; Safieh-Garabedian, B. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. **J Neuroimmunol**, 86:142-50, 1998.

Kawabata, A. Prostaglandin E<sub>2</sub> and pain – an update. **Biol Pharm Bull**, 34:1170-3, 2011.

Kedzierski, R., Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41:851-76, 2001.

Khodorova, A.; Fareed, M.U.; Gokin, A.; Strichartz, G.R.; Davar, G. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. **J Neurosci**, 22:7788-96, 2002.

Khodorova, A.; Navarro, B.; Jouaville, L.S.; Murphy, J.E.; Rice, F.L.; Mazurkiewicz, J.E.; Long-Woodward, D.; Stoffel, M.; Strichartz, G.R.; Yukhananov, R.; Davar, G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med**, 9:1055-61, 2003.

Khodorova, A., Montmayeur, J., Strichartz, G. Endothelin receptors and pain. **J Pain**, 10: 4-28, 2009a.

Khodorova, A.; Richter, J.; Vasko, M.R.; Strichartz, G. Early and late contributions of glutamate and CGRP to mechanical sensitization by endothelin-1. **J Pain**, 10(7):740-9, 2009b.

Khodorova, A.; Strichartz, G. Contralateral paw sensitization following injection of endothelin-1: effects of local anesthetics differentiate peripheral and central processes. **Neuroscience**, 165:553-60, 2010.

Kidd, B.L.; Urban, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, 87:3-11, 2001.

Kim, J.; Alger, B.E. inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. **Nat Neurosci**, 7:697-8, 2004.

de Koninck, Y.; Henry, J.L. Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. **Proc natn Acad Sci USA**, 88:1344-48, 1991.

Kindt, K.S.; Viswanath, V.; Macpherson, L.; Quast, K.; Hu, H.; Patapoutian, A.; Schafer, W.F.. *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation. **Nat Neurosci**, 10:568-77, 2007.

Kress, M. Nociceptor sensitization by proinflammatory cytokines and chemokines. **Open Pain J**, 3-97-107, 2010.

Kuraishi, Y.; Hirota, N.; Sato, Y.; Hanashima, N.; Takagi, H.; Satoh, M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. **Neuroscience**, 30:241-50, 1989.

Kwan, K.Y.; Allchorne, A.J.; Vollrath, M.A.; Christensen, A.P.; Zhang, D.S.; Woolf, C.J.; Corey, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical,

and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**, 50:277–89, 2006.

Latremoliere, A.; Woolf, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, 10:895-926, 2009.

Leger, T.; Grist, J.; D'Acquisito, F.; Clark, A.K.; Malcangio, M. Glatiramer acetate attenuates neuropathic allodynia through modulation of adaptative immune cells. **J Neuroimmunol**, 234:19-26, 2011.

Levy, M.; Brune, K.; Zylber-Katz, E.; Cohen, O.; Caraco, Y.; Geisslinger, G. Cerebrospinal fluid prostaglandins after systemic dipyrone intake. **Clin Pharmacol Ther**, 64:117-22, 1998.

Lin, C.; Fumimasa, A.; Barrett, L.; Wang, H.; Takada, J.; Samad, T. A.; Woolf, C.J. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **J Pharmacol Exp Ther**, 319:1096-103, 2006.

Loesch, A.; Dashwood, M.R.; Coppi, A.A. Immunoreactive endothelin-1 and endothelin-A receptors in basilar artery perivascular nerves of young and adult capybaras. **Cell Tissue Organs**, 198:47-56, 2013.

Loeser, J.D.; Treede, R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137:473-7, 2008.

López-Muñoz, F.J.; Godínez-Chaparro, B.; Huerta-Cruz, J.C.; Guevara-López, U. The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain. **Pharmacol Biochem Behav**, 91:196-201, 2008.

Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. Mode of action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, 114:375-81, 1985.

Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm Res**, 45:308-11, 1996. (abstract)

Maciel, I.S.; Silva, R.B.M.; Morrone, F.B.; Calixto, J.B.; Campos, M.M. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. **PLoS One**, 8:e77227, 2013.

Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. **Anesthesiology**, 79:270–81, 1993.

Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandins E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. **Br J Pharmacol**, 114:1069-75, 1995.

Malvar, D. do C.; Soares, D.M.; Fabrício, A.S.; Kanashiro, A.; Machado, R.R.; Figueiredo, M.J.; Rae, G.A.; de Souza, G.E. The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. **Br J Pharmacol**, 162:1401-1409, 2011.

Marani, E.E.; Lakke, E.A.J.F. Peripheral nervous system topics. In: Mai, J.K.; Paxinos, G. (Ed.). **The Human Nervous System**. 3. ed. Salt Lake City: Academic Press, 2011., p. 91.

Marchand, F.; Perretti, M.; McMahon, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, 6:521-32, 2005.

Marchand, S. Applied pain neurophysiology. In: Beaulieu, P. et al. (Ed.). **Pharmacology of pain**. Seattle: Iasp Press, 2010. p. 3-26.

Masaki, T. Historical review: Endothelin. **Trends Pharmacol Sci**, 25:219-24, 2004.

Matzner, Y.; Drexler, R.; Levy, M. Effect of dipyron, acetylsalicylic acid and acetaminophen on human neutrophil chemotaxis. **Eur J Clin Invest**, 14:440-3, 1984 (abstract).

Maves, T.J.; Pechman, P.S.; Meller, S.T.; Gebhart, G.F. Ketorolac potentiates morphine antinociception during visceral nociception in the rat. **Anesthesiology**, 80:1094–101, 1994.

Menéndez, L.; Lastra, A.; Hidalgo, A.; Baamonde, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 367:28-34, 2003.



Milano, J.; Rossato, M.F.; Oliveira, S.M.; Drewes, C.; Machado, P.; Beck, P.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P.; Mello, C.F.; Rubin, M.A.; Ferreira, J.; Bonacorso, H.G. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolone methyl ester in models of inflammatory pain in mice. **Life Sci**, 83:739-46, 2008.

Millicamps, M.; Laferrière, A.; Ragavendran, J.V.; Stone, L.S.; Coderre, T.J. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**, 151:174-83, 2010.

Milligan, E.D.; Langer, S.J.; Sloane, E.M.; He, L.; Wieseler-Frank, J.; O'Connor, K.; Martin, D.; Forsayeth, J.R.; Maier, S.F.; Johnson, K.; Chavez, R.A.; Leinwand, L.A.; Watkins, L.R. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. **Eur J Neurosci**, 21:2136-48, 2005.

Milligan, E.D.; Penzkover, K.R.; Soderquist, R.G.; Mahoney, M.J. Spinal interleukin-10 therapy to treat neuropathic pain. **Neuromodulation**, 15(6):520-6, 2012.

Miyauchi, T., Masaki, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. **Annu Rev Physiol**, 61:391-415, 1999.

Moffat, R.; Rae, C.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesth Intensive Care**, 12:12-25, 2011.

Motta, E.M.; Calixto, J.B.; Rae, G.A. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. **Exp Bio Med (Maywood)**, 231:1141-5, 2006.

Motta, E.M.; Chichorro, J.G.; D'Orléans-Juste, P.; Rae, G.A. Roles of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in nociception and chemical, thermal and mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in the rat hindpaw. **Peptides**, 30:918-25, 2009.

Mujenda, F.H.; Duarte, A.M.; Reilly, E.K.; Strichartz, G.R. Cutaneous endothelin-A receptors elevate post-incisional pain. **Pain**, 133:161-73, 2007.

Muñoz, J.; Navarro, C.; Noriega, V.; Pinardi, G.; Sierralta, F.; Prieto, J.C.; Miranda, H.F. Synergism between COX-3 inhibitors in two animals models of pain. **Inflammopharmacol**, 18:65-71, 2010.

Neugebauer, V.; Schaible, H-G.; He, X.; Lücke, T.; Gündling, P.; Schmidt, R.F. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dypirone. **Agent Actions**, 41:62-70, 1994.

Neumann S.; Doubell, T.P.; Leslie, T.; Woolf, C.J. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. **Nature**, 384:360-4, 1996.

Nussdorfer, G.G.; Rossi, G.P.; Malendowicz, L.K.; Mazzochi, G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. **Pharmacol Rev**, 51:403-37, 1999.

Oliveira, C.M.; Sakata, R.K.; Issy, A.M.; Gerola, R.M.; Salomão, R. Cytokines and pain. **Rev Bras Anesthesiol**, 61:255-9, 2011.

Ortiz, M.I.; Castañeda-Hernández, G.; Granados-Soto, V. Possible involvement of potassium channels in peripheral antinociception induced by metamizol: lack of participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Pharmacol Biochem and Behav**, 74:465-70, 2003.

Osborne, P.B.; Vaughan, C.W.; Wilson, H.I.; Christie, M.J. Opioid inhibition of rat periaqueductal gray neurones with identified projections to the rostral ventromedial medulla in vitro. **J Physiol (Lond)**, 490:383–89, 1996.

Peters, C.M.; Lindsay, T.H.; Pomonis, J.D.; Luger, N.M.; Ghilardi, J.R.; Sevcik, M.A.; Mantyh, P.W. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. **Neurosci**, 126:1043-52, 2004.

Pierre, S.C.; Schmidt, R.; Brenneis, M.; Michaelis, G.; Geisslinger, G.; Scholich, K. Inhibition of cyclooxygenase by dipyrene. **Br J Pharmacol**, 151:494-503, 2007.

Piovezan, A.P., D'Orléans-Juste, P.; Tonussi, C.R.; Rae, G.A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur J Pharmacol**, 12:352, 1998.

Piovezan, A.P., D'Orléans-Juste, P., Souza, G.E., Rae, G.A. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br J Pharmacol**, 129: 961-8, 2000.

Plant, T.D.; Zöllner, C.; Kepura, F.; Mousa, S.S.; Eichhorst, J.; Schaefer, M.; Furkert, J.; Stein, C.; Oksche, A. Endothelin potentiates TRPV1 via ET<sub>A</sub> receptor-mediated activation of protein kinase C. **Mol Pain**, 3:35-48, 2007.

Pomonis, J.D.; Rogers, S.D.; Peters, C.M.; Ghilardi, J.R.; Mantyh, P.W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci**, 21:999-1006, 2001.

Poole, S.; Cunha, F.Q.; Selkirk, S.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1. **Br J Pharmacol**, 115:648-88, 1995.

Porro, C.A.; Cavazzuti, M. Spatial and temporal aspects of spinal Cord and brainstem activation in the formalin pain model. **Prog Neurobiol**, 41:565-607, 1993.

Ren, K.; Dubner, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat Med**, 16: 1267-76, 2010.

Rexed, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J Comp Neurol**, 96:415-95, 1952.

Rezende, R.M.; França, D.S.; Menezes, G.B.; dos Reis, W.G.P.; Bakhle, Y.S.; Francischi, J.N. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. **Br J Pharmacol**, 153:760-8, 2008.

Rhen, T.; Cidlowski, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms of old drugs. **N Engl J Med**, 353:1711-23, 2005.

Ricciotti, E.; FitzGerald, G.A.; Prostaglandins and inflammation. **J Am Heart Assoc**, 31:986-1000, 2011.

Rogosch, T.; Sinning, C.; Podlewski, A.; Watzer B.; Schlosburg, J.; Lichtman, A.H.; Cascia, M.G.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Nüsing, R.;

Imming, P. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). **Bioorg Med Chem**, 20:101-7, 2011.

Rohdewald, P.; Drehsen, G.; Milsmann, E.; Derendorf, H. Relationship between saliva levels of metamizol metabolites, bioavailability and analgesic efficacy. **Arzneimittelforschung**, 33:985-8, 1983. (abstract)

Rosland, J.K.; Tjølsen, A.; Maehle, B.; Hole, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, 42:235-42, 1990.

Rubanyi, G.M.; Polokoff, M.A. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, 46:325-415, 1994.

Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Winter, J.; Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 $\beta$  to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, 115:1265-75, 1995.

Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature** 348:732-5, 1990.

Sampaio, A.L.; Rae, G.A.; Henriques, M.G. Participation of endogenous endothelins in delayed eosinophil and neutrophil recruitment in mouse pleurisy. **Inflamm Res**, 49:170-6, 2000.

Sánchez, S.; Mastín, M.J.; Ortiz, P.; Motilva, V.; Alarcón de la Lastra, C. Effects of dipyrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa: comparison with acetaminophen and diclofenac. **Dig Dis Sci**, 47:1389-98, 2002.

Santos, G.G.; Maia, J.T.; Dias, E.V.; Athie, M.C.P.; Parada, C.A. Involvement of CB1 and CB2 cannabinoid receptors of peripheral tissue in the anti-hyperalgesic effect of dipyrone and its bioactive metabolites [abstract]. In: 8<sup>th</sup> Congress of the European Federation of IASP Chapter (EFIC). Firenze, Itália. Abstract n<sup>o</sup>: 422. 9-13 Outubro, 2013

Sauzem, P.D.; Sant'Anna, Gda.S.; Machado, P.; Duarte, M.M.; Ferreira, J.; Mello, C.F.; Beck, P.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N.; Martins, M.A.; Rubin, M.A. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on

chronic inflammatory pain model in rats. **Eur J Pharmacol**, 616:91-100, 2009.

Schaible, H.; Ebersberger, A.; Natura, G. Update on peripheral mechanism of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Res Ther**, 13:210-8, 2011.

Seybold, V.S.; Jia, Y.P.; Abrahams, L.G. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. **Pain**, 105:47-55, 2003.

Shen, K-F.; Zhu, H-Q.; Wei, X-H.; Wang, J.; Li, Y-Y.; Pang, R-P.; Liu, X-G. Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Exp Neurol**, 247:466-75, 2013.

Shimada, S.G.; Otterness, I.G.; Stitt, J.T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents Actions**, 41:188-92, 1994.

Schlosburg, J.E.; Radanova, L.; Marzo, V.; Imming, P.; Lichtman, A.H. Evaluation of the endogenous cannabinoid system in mediating the behavioural effects of dipyrone (metamizol) in mice. **Behav Pharmacol**, 23:722-6, 2012.

Siebel, J.S.; Beirith, A.; Calixto, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. **Brain Res**, 1003:61-7, 2004.

Souter, A.J.; Fredman, B.; White, P.F. Controversies in the perioperative use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Anesth Analg**, 79:1178-90, 1994.

Souza, G.E.P.; Cardoso, R.A.; Melo, M.C.C.; Fabricio, A.S.C.; Silva, V.M.S.; Lora, M.; De Brum-Fernandes, A.J.; Rae, G.A.; Ferreira, S.H.; Zampronio, A.R. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrone in rats. **Inflam Res**, 51:24-32, 2002.

Stein, C.; Clark, J.D.; Spencer, R.H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Res Rev**, 60:90-113, 2009.

Stösser, S.; Agarwal, N.; Tappe-Theodor, A.; Yanagisawa, M.; Kuner, R. Dissecting the functional significance of endothelin A receptors in

peripheral nociceptors in vivo via conditional gene deletion. **Pain**, 148:206-14, 2010.

Stow, L.R.; Jacobs, M.E.; Wingo, C.S.; Cain, B.D. Endothelin-1 gene regulation. **FASEB J**, 25: 16-28, 2011.

Suzuki, M.; Mizuno, A.; Kodaira, K.; Imai, M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. **J Biol Chem**, 278:22664–8, 2003.

Talbodec, A.; Berkane, N.; Blandin, V.; Breittmayer, J. P.; Ferrari, E.; Frelin, C.; Vigne, P. Aspirin and sodium salicylate inhibit endothelin ET<sub>A</sub> receptors by allosteric type of mechanism. **Mol Pharmacol**, 57:797-804, 2000.

Tao, Y-X.; Gu, J.; Stephens, R.L. Role of spinal cord glutamate transporters during normal sensory transmission and pathological pain states. **Mol Pain**, 1:30-8, 2005.

Taskinen, H.S.; Olsson, T.; Bucht, A.; Khademi, M.; Svelander, L.; Roytta, M. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA. **J Neuroimmunol**, 102:17–25, 2000.

Tatsuo, M.A.; Carvalho, W.M.; Silva, C.V.; Miranda, A.E.; Ferreira, S.H.; Francisci, J.N. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model, **Inflammation**, 18:399-405, 1994. (abstract)

Telleria-Diaz, A.; Schmidt, M.; Kreusch, S.; Neubert, A-K.; Schache, F.; Vazquez, E.; Vanegas, H.; Schaible, H-G.; Ebersberg, A. Spinal antinociceptive effects of cyclooxygenase inhibition during inflammation: involvement of prostaglandins and endocannabinoids. **Pain**, 148:26-35, 2010.

Tjølsen, A.; Berge, O-G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: and evaluation of the method. **Pain**, 51:5-17, 1992.

Thompson, S.W.N.; Dray, A.; Urban, L. Injury-induced plasticity of spinal reflex activity: NK1 neurokinin receptor activation and enhanced A- and C-fiber mediated responses in the rat spinal cord *in vitro*. **J Neurosci**, 14:3872-87, 1994.

Üçeyler, N.; Valenza, R.; Stock, M.; Schedel, R.; Sprotte, G.; Sommer, C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. **Arthritis Rheum**, 54: 2656–64, 2006.

Üçeyler, N.; Rogausch, J.P.; Toyka, K.V.; Sommer, C. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. **Neurology**, 69:42–49, 2007.

Valenzuela, F.; García-Saisó, S.; Lemini, C.; Ramírez-Solares, R.; Vidrio, H.; Mendonza-Ferández, V. Metamizol acts as an ATP sensitive potassium channel opener to inhibit the contracting response induced by angiotensin II but not to norepinephrine in rat thoracic aorta smooth muscle. **Vasc Pharmacol**, 43:120-7, 2005.

Vanegas, H.; Tortorici, V.; Eblen-Zajjur, A.; Vásquez, E. PAG-microinjected dipyrone (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. **Brain Res**, 759:171-74, 1997.

Vanegas, H.; Shaible, H-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog Neurobiol**, 64:327-63, 2001.

Vazquez, E.; Hernandez, N.; Escobar, W.; Vanegas, H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. **Brain Res**, 1048:211-7, 2005.

Vergne-Salle, P.; Beneytout, J. Targeting the cyclooxygenase pathway. In: Beaulieu, P. et al. (Ed.). **Pharmacology of Pain**. Seattle: Iasp Press, 2010. p. 3-26.

Verri, W.A.; Schivo, I.R.S.; Cunha, T.M.; Liew, F.Y.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. **J Pharmacol Exp Therap**, 310:710-7, 2004.

Verri, W.A.; Molina, R.O.; Schivo, I.R.S.; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ET<sub>B</sub> receptors in rats. **J Pharmacol Exp Therap**, 315:609-15, 2005.

Verri, W.A.; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol & Therap**, 112:116-138, 2006.

Verri, W.A.; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Liew, F.Y.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Antigen-induced inflammatory hypernociception in mice is mediated by IL-18. **Brain Behav Immun**, 21:535-43, 2007.

Verri, W.A.; Cunha, T.M.; Magro, D.A.; Guerrero, A.T.G.; Vieira, S.M.; Carregaro, V.; Souza, G.R.; Henriques, M.G.M.O.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Targeting endothelin ETA and ETB receptors inhibits antigen-induced neutrophil migration and mechanical hypernociception in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 379:271-9, 2009.

Vidal-Torres, A.; Carceller, A.; Zamanillo, D.; Merlos, M.; Vela, J.M.; Fernández-Pastor, B. Evaluation of the formalin-induced pain behavior and glutamate release in the spinal dorsal horn using in vivo microdialysis in conscious rats. **J Pharmacol Sci**, 120:129-32, 2012.

Zeilhofer, H.U.; Zeilhofer, U.B. Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. **Neurosci Lett**, 437:170-4, 2008.

Zelenka, M.; Schäfers, M.; Sommer, C. Intraneural injection of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, 116:257–263, 2005.

Zhang, J-M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Anesthesiol Clin**, 45:27-37, 2007.

Zhou, Q-L; Strichartz, G.; Davar, G. Endothelin-1 activates ET receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons. **Neuroreport**, 12:3853–57, 2001.

Zhou, Z.; Davar, G.; Strichartz, G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. **J Neurosci** 22:6325-30, 2002.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16:109-110, 1983.



Zylber-Katz, E.; Granit, L.; Levy, M. Formation and excretion of dipyrone metabolites in man. **Eur J Pharmacol**, 42:187-91, 1992.

Williams, D.L.; Jones, K.L.; Pettibone, D.J.; Lis, E.V.; Clineschmidt, B.V. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptors subtypes. **Biochem Biol Res Commun**, 175(2):556-61, 1991.

Woolf, C.J.; Allchorne, A.; Safieh-Garabedian, B.; Poole, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, 121:417-24, 1997.

Woolf, C.J.; Costigan, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96:7723-30, 1999.

Woolf, C.J.; Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, 288:1765-9, 2000.

Woolf, C.J.; Ma, Q. Nociceptors – Noxious stimuli detectors. **Neuron**, 55:353-64, 2005.

Yaksh, T.L.; Jessell, T.M.; Gamse, R.; Mudge, A.W.; Leeman, S. E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, 286:155-7, 1980.

Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332: 411-415, 1988. (abstract).



## 9. ANEXO

### 9.1. Documento de aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00664

**Título**

Comparação da atividade antinociceptiva da dipirona com a de seus principais metabólitos em modelos de dor aguda e crônica.

**Data de Entrada**

13/05/2011

**Resultado:**

Aprovado

**Data / Prazo**

21/10/2011

**Considerações**

Ofício nº 156/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Giles Alexander Rae, Departamento de Farmacologia – CCB.

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: 892 unidades *Mus musculus* (camundongos) e 2426 unidades *Rattus norvegicus* (ratos).

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 03/02/2016**

Data 03/11/2011

**Parecer(es):**

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE**